

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal

José Bosco Isaac Junior

**IMPACTOS DO ISOXAFLUTOLE NA BIOLOGIA, CORPO GORDUROSO E
HEMOLINFA DE *PODISUS NIGRISPINUS* (DALLAS, 1851) (HEMIPTERA:
PENTATOMIDAE).**

Diamantina
2019

José Bosco Isaac Junior

**Impactos do Isoxaflutole na biologia, corpo gorduroso e hemolinfa de *Podisus nigrispinus*
(Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae).**

**Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Produção Vegetal da Universidade Federal dos
Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito
para obtenção do título de Doutor.**

**Orientador: Prof.^o Dr. Marcus Alvarenga Soares
Coorientadora: Prof.^a Dra. Conceição Aparecida
dos Santos**

Diamantina

2019

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

I73i

Isaac Junior, José Bosco

Impactos do Isoxaflutole na biologia, corpo gorduroso e hemolinfa de *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae) / José Bosco Isaac Junior, 2020.

58 p. : il.

Orientador: Marcus Alvarenga Soares

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.

1. Asopinae. 2. Controle biológico. 3. Herbicida. I. Soares, Marcus Alvarenga. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 632.96

JOSÉ BOSCO ISAAC JUNIOR

Impactos do Isoxaflutole na biologia, corpo gorduroso e hemolinfa de *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera:Pentatomidae).

Tese apresentada ao DOUTORADO EM PRODUÇÃO VEGETAL, nível de DOUTORADO como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM PRODUÇÃO VEGETAL

Orientador (a): Prof. Dr. Marcus Alvarenga Soares

Data da aprovação : 18/12/2019


Dr.ª ISABEL MOREIRA DA SILVA - UFVJM


Prof.Dr. MARCUS ALVARENGA SOARES - UFVJM


Dr. RONNIE VON DOS SANTOS VELOSO - UFVJM


Dr. LÍRIO COSME JÚNIOR - UFV

DIAMANTINA

Dedico este trabalho à minha Mãe Glêda e meu Pai Bosco, aos meus irmãos Renato e Rodrigo. À minha companheira, esposa e amiga Beatriz, aos meus filhos João Guilherme e Clara.

contra negantem principia non est disputandum

AGRADECIMENTOS

As palavras não serão suficientes para conseguir ser justo com todos aqueles que contribuíram. Todos foram significativos!

Ao meu orientador Marcus Alvarenga Soares pela paciência em aceitar um candidato em estágio geriátrico. Sua generosidade e capacidade serão sempre referências para meu crescimento humano e intelectual. É o mínimo que posso agradecer.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, em especial ao José Barbosa e José Sebastião Cunha pelas experiências em searas que para mim eram completamente alienígenas. Permitiram a mim, como biólogo, compartilhar desse conhecimento tão sofisticado. E ao Germano, pela peculiar maneira de enxergar os sistemas biológicos. Mesmo na sua necessidade tabagírea, não ficava obscurecido pela fumaça. Intelecto sempre intenso.

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico, Gilson, Daniel, Diovana, e as Palmísticas Elizângela e Zaira, sempre estavam disponíveis em colaborar e trocar “figurinhas”. Ao Ricardo pelo suporte técnico e boas conversas. E ao Professor Lourenço pela amizade e contribuições que me permitiram conhecer melhor esse vasto e maravilhoso mundo dos insetos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Citologia, Magdala e Robson, pelos cafés e bate papos descontraídos.

Aos amigos do dia a dia, Conceição e Samuel. Foram essenciais nesse processo, com Conceição sendo responsável pelo meu contato inicial com os insetos e co-orientadora nas horas importantes! Samuel, você é o cara!!

À secretaria do PPGPV pela presteza em resolver os pequenos entraves administrativos e facilitar a vida de todos os envolvidos nesse ambiente.

A todos vocês agradeço imensamente.

RESUMO

As espécies do gênero *Eucalyptus* destinadas ao plantio comercial destacam-se por apresentarem rápido crescimento e boa adaptabilidade em campo, mas como em toda monocultura está sujeita à matocompetição e ao ataque de insetos pragas, e por causa disso, esses organismos podem afetar o desenvolvimento e a produtividade desse sistema de silvicultura. Como forma de evitar danos irreversíveis utilizam-se diversas formas de controle sendo que a principal é por meio de substâncias químicas, como os herbicidas e inseticidas. Apesar da efetividade do controle químico, já foram observados impactos sobre a população de insetos herbívoros, mas também com resultados negativos sobre organismos não alvos como percevejos predadores Asopinae. Os efeitos toxicológicos desses agrotóxicos podem estar associados às alterações das atividades fisiológicas desses insetos, como o desenvolvimento e reprodução, podendo afetar o comportamento, com a consequente redução da sua atividade predatória. Uma prática importante é o controle biológico, ou seja, a utilização de inimigos naturais sobre uma população de insetos pragas. Esse tipo de controle visa reduzir a população de pragas até que a mesma não possa mais causar danos econômicos à cultura. A falta de conhecimentos das possíveis modificações em organismos não alvos resultantes do contato com herbicidas prejudica a avaliação dos reais impactos na biologia e comportamento dessas espécies, principalmente, os relacionados às alterações morfofisiológicas do corpo gorduroso e da hemolinfa e aquelas referentes aos impactos no ciclo reprodutivo.

Palavras chave: Asopinae, Controle Biológico, Herbicida.

ABSTRACT

Species of the genus *Eucaliptus* intended for commercial planting stand out for their rapid growth and good adaptability in the field, but as in all monoculture is subject to competition weeds and insect pests, and because of this these organisms can affect the development and the productivity of this forestry system. In order to prevent irreversible damages various forms of control are used, the main one being through of chemical substances such as herbicides and insecticides. Despite the effectiveness of chemical control, impacts have already been observed on the population of herbivorous insects, but also with negative results on non-target organisms such as predatory stink bugs Asopinae. The toxicological effects of these pesticides may be associated with changes in the physiological activities of these insects, such as development and reproduction, and may affect their behavior, with the consequent reduction of their predatory activity. An important practice is biological control, that is, the use of natural enemies on a pest insect population. This type of control aims to reduce the pest population until it can no longer cause economic damage to the crop. The lack of knowledge of possible modifications in non-target organisms resulting from contact with herbicides impairs the evaluation of the actual impacts on the biology and behavior of these species, especially those related to the morphophysiological alterations of the fat body and hemolymph and those related to the impacts on the reproductive cycle.

Key words: Asopinae, Biological control, Herbicide

SUMÁRIO

1 – Introdução Geral.....	9
2 – Objetivo Geral.....	11
2.1 – Objetivos Específicos.....	11
CAPITULO I	
IMPACTOS DO ISOXAFLUTOLE NA BIOLOGIA DE <i>Podisus nigrispinus</i> (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae)	
Resumo.....	17
Abstract.....	18
Introdução.....	19
Material e Métodos.....	20
Resultados.....	21
Discussão.....	24
Conclusão.....	27
Referências.....	28
CAPITULO II	
IMPACTOS DO ISOXAFLUTOLE NA HEMOLINFA E NO CORPO GORDUROSO DE <i>Podisus nigrispinus</i> (Dallas, 1851)(Hemiptera: Pentatomidae).	
Resumo.....	32
Abstract.....	33
Material e Métodos.....	34
Resultados.....	38
Discussão.....	48
Conclusão.....	51
Referências.....	52
3 – Considerações Finais.....	57

1 – INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Eucalyptus* spp. é amplamente utilizado em plantios florestais no Brasil para produção de matérias-primas como celulose, carvão e diversos outros produtos madeireiros e não madeireiros, contribuindo com a redução da exploração de florestas nativas (CORREIA *et al.*, 2013; SNIF, 2019). As espécies destinadas ao plantio comercial destacam-se por apresentarem rápido crescimento e boa adaptabilidade em campo. No entanto, nos primeiros quatro anos de desenvolvimento do eucalipto, estes podem estar sujeitos à interferência de plantas infestantes que, dependendo do tempo e da intensidade, afetam o desenvolvimento e a produtividade da cultura, como por exemplo, a redução do diâmetro da madeira (ROCHA, 2014). Neste contexto, o controle da matocompetição torna-se um desafio fundamental para garantir a produção comercial. Esse controle pode ser feito utilizando diferentes métodos, sendo o uso de herbicidas considerado o mais eficiente devido à facilidade de aplicação, baixo custo e relativa seletividade, assegurando dessa forma a sustentabilidade da produção (FERREIRA *et al.*, 2010; TUFFI-SANTOS *et al.*, 2013).

O uso sistemático dos herbicidas pode causar impactos, tais como alterações em funções dos ecossistemas relacionadas à ciclagem de nutrientes e às interações tróficas entre fauna, flora e a microbiota (KLETER *et al.*, 2011; ZALLER, 2014; ALCÁNTARA DE LA CRUZ *et al.*, 2016b; DUKE, 2017). Além disso, outros relatos mostram significativas modificações das populações de artrópodes herbívoros com resultados negativos sobre os organismos não alvos como seus inimigos naturais (MENEZES *et al.*, 2012; SEAGRAVES & LUNDGREN, 2012; ZANUNCIO *et al.*, 2014; CAMILO *et al.*, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2016). Como relatado nesses trabalhos, o potencial biocida dos herbicidas, especificamente aqueles de ação sistêmica como o Isoxaflutole, justifica estudos pautados no manejo de plantas daninhas e seus efeitos diretos e indiretos associados a essa prática, principalmente àqueles relacionados aos insetos não alvos.

O herbicida Isoxaflutole, [(4-(2-metanossufonil-4-trifluorometilbenzoil)-5-ciclopropil isoxazole)], caracteriza-se por ser sistêmico de ação pré-emergente, utilizado no controle de monocotiledôneas e dicotiledôneas (ALLETO *et al.*, 2012). A atividade desse herbicida está relacionada ao impedimento da biossíntese de carotenoides, os quais são moléculas essenciais à proteção da clorofila. Sem esse mecanismo dissipativo não há realização do processo de fotossíntese, levando à morte da planta (PALLETT *et al.*, 1998). Apesar dos efeitos específicos dos herbicidas, estes não são formados apenas pelo ingrediente ativo. As

formulações comerciais contêm uma grande variedade de substâncias adjuvantes, e seus impactos sobre organismos não alvos precisam ser avaliados por meio de estudos minuciosos (PROCÓPIO *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2016; MENEZES & SOARES, 2016; ZANUNCIO *et al.*, 2018).

Além do controle químico voltado ao manejo de plantas daninhas, a cultura do eucalipto demanda um intenso controle de insetos pragas, cuja parcela de custos é tão significativa quanto à interferência da matocompetição. Para o controle de pragas a principal ação é a utilização de inseticidas. Estes, apesar de serem efetivos, podem causar alterações nas populações de insetos afetando aquelas consideradas benéficas (BIANCHI *et al.*, 2010; ZANUNCIO *et al.*, 2011; MENEZES *et al.*, 2012; CAMILO *et al.*, 2016; DE CASTRO, *et al.*, 2018).

O Manejo Integrado de Pragas consiste numa filosofia de controle que visa manter as populações de insetos pragas em densidades que não causem prejuízos econômicos. Constitui um sistema de decisão para uso de táticas de controle, usadas de forma isolada ou associadas harmoniosamente, levando em conta os preceitos ambientais, econômicos e sociais (KOGAN, 1998). Uma prática importante é o controle biológico, ou seja, a utilização de inimigos naturais sobre uma população de insetos pragas. Esse tipo de controle visa reduzir a população de pragas até que a mesma não possa mais causar danos econômicos à cultura. A partir do conhecimento dos organismos praga, o controle biológico auxilia na redução do uso de substâncias químicas minimizando o risco e o impacto para a fauna e a flora, favorecendo o restabelecimento do equilíbrio ambiental (KASER & HEIMPEL, 2015; PIRES *et al.*, 2015; TOMASETTO *et al.*, 2017).

Os percevejos do gênero *Podisus* spp. são conhecidos por serem ótimos modelos para estudos de organismos controladores de pragas, pois são predadores que ocorrem em ambientes naturais, caracterizados pela sua agressividade e voracidade (ZANUNCIO *et al.*, 2014; PIRES *et al.*, 2015). O percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae, Asopinae), destaca-se por ser generalista, alimentando-se de formas imaturas de várias espécies de insetos considerados praga para as culturas agrícolas e florestais, tais como aqueles pertencentes às ordens Lepidoptera e Coleoptera. Além de predarem outros insetos, suplementam sua dieta extraindo seiva vegetal das plantas que hospedam suas presas, sendo considerados por este hábito organismos zoofitófagos (MENEZES *et al.*, 2012; SOTO *et al.*, 2012; ZANUNCIO *et al.*, 2014; GRIGOLLI *et al.*, 2017; LIRA *et al.*, 2019). Por causa desses hábitos esses insetos podem estar expostos aos herbicidas utilizados no controle de plantas daninhas na cultura do eucalipto. Tal exposição pode ser direta, por contato com gotas advindas

da pulverização, ou indireta, pela ingestão de presas ou seiva de plantas contaminadas. Contatos diretos ou indiretos com agrotóxicos podem levar a uma diminuição na qualidade do alimento disponível, que poderá refletir na redução das atividades fisiológicas, como a fecundidade e a fertilidade, afetando a reprodução e o comportamento com consequente alteração da atividade predatória (CAMILO *et al.*, 2012; CASTILHOS *et al.*, 2014; MENEZES *et al.*, 2014; MALAQUIAS *et al.*, 2015).

A falta de conhecimentos das possíveis modificações em organismos não alvo resultantes do contato com herbicidas prejudica a avaliação dos reais impactos na biologia e comportamento dessas espécies, principalmente, os relacionados às alterações morfofisiológicas do corpo gorduroso e da hemolinfa (ROMA *et al.*, 2010; CHARLES & KILLIAN, 2015) e aquelas referentes aos impactos no ciclo reprodutivo (ZANUNCIO *et al.*, 2011; ZANUNCIO *et al.*, 2013; MENEZES *et al.*, 2014; LEITE *et al.*, 2016; MENEZES & SOARES, 2016).

2 – OBJETIVO GERAL

No presente trabalho objetivou-se verificar os efeitos do Isoxaflutole na biologia, no corpo gorduroso e na hemolinfa de *Podisus nigripinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae).

2.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do Isoxaflutole na biologia reprodutiva e desenvolvimento das fases ninfais de *Podisus nigripinus*, utilizando-se para isso o formulado comercial Fordor[®] (750 WG) e o ingrediente ativo.

- Avaliar os efeitos do Isoxaflutole na morfologia e histologia do corpo gorduroso e na hemolinfa utilizando-se o formulado comercial Fordor[®] (750 WG) e o ingrediente ativo.

- Correlacionar as possíveis alterações na biologia reprodutiva e no desenvolvimento de *Podisus nigripinus* com mudanças observadas na morfologia do corpo gorduroso e na hemolinfa.

REFERÊNCIAS

- ALCANTARA DE LA CRUZ, R.; ROJANO-DELGADO, A. M.; GIMENEZ, M. J.; CRUZ-HIPOLITO, H. E.; DOMINGUEZ-VALENZUELA, J. A.; BARRO, F.; DE PRADO, R.. 2016b. First resistance mechanisms characterization in glyphosate-resistant *Leptochloa virgata*. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1742.
- ALLETTO, L.; COQUET, Y.; BERGHEAUD, V.; BENOIT, V. 2012. Water pressure head and temperature impact on isoxaflutole degradation in crop residues and loamy surface soil under conventional and conservation tillage management. *Chemosphere*, 88: 1043–1050.
- BIANCHI, F. J.J.A.; SCHELLHORN, N.A.; BUCKLEY, Y.M.; POSSINGHAM, H.P., 2010. Spatial variability in ecosystem services: simple rules for predator mediated pest suppression. *Ecological Applications*, 20: 2322–2333.
- CAMILO, S. S.; SOARES, M.A.; LEITE, G.L.D.; DOS SANTOS, J.B.; DE ASSIS JUNIOR, S. L.; ZANUNCIO, J. C. 2016. Do floral resources in *Eucalyptus* plantations affect fitness parameters of the parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae)? *Phytoparasitica*, 44: 651-659.
- CASTILHOS, R.V.; GRÜTZMACHER, A. D.; SIQUEIRA, P. R. B.; MORAES, I. L.; GAUER, C. J. 2014. Seletividade de agrotóxicos utilizados em pessegueiro sobre ovos e pupas do predador *Chrysoperla externa*. *Ciência Rural*, 44: 1921-1928.
- CHARLES, H. M.; KILLIAN, K. A., 2015. Response of the insect immune system to three different immune challenges. *Journal Insect Physiology*, 81: 97-108.
- CORREIA, A. C. G.; SANTANA, R. C.; OLIVEIRA, M. L. R.; TITON, M.; ATAÍDE, G. M.; LEITE, F. P. 2013. Volume de substrato e idade: influência no desempenho de 185 mudas clonais de eucalipto após replantio. *Revista Cerne*, 19: 185-191.

DE CASTRO, A. A; LEGASPI, J. C.; TAVARES, W. S.; MEAGHER- JR., R. L.; NEIL MILLER, N.; KANGA, L.; HASEEB, M.; SERRÃO, J. E.; WILCKEN, C. F.; ZANUNCIO, J. C. 2018. Lethal and behavioral effects of synthetic and organic insecticides on *Spodoptera exigua* and its predator *Podisus maculiventris*. PLoS ONE, 13: 1-14.

DUKE, S. O. 2017. The History and current status of glyphosate. Pest Management Science, 74: 1027-1034.

FERREIRA, L.R.; MACHADO, A.F.L.; FERREIRA, F.A. SANTOS, L.D.T. (Org.) 2010. Manejo integrado de plantas daninhas na cultura do eucalipto. 1ª Edição. Editora UFV.

GONÇALVES, T.S.; SOARES, M.A.; SANTOS, C.A.; SANTOS, D.A.; SANTOS, J.B. BARROSO, G.A. 2016. Does ingestion of isoxaflutole herbicide affect the midgut and salivary glands of Pentatomidae predators? Planta Daninha, 34: 125-132.

GRIGOLLI, J. F. J., GRIGOLLI, M. M. K., RAMALHO, D. G., MARTINS, A. L., VACARI, A.M., DE BORTOLI, S. A. 2017. Phytophagy of the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae) fed on prey and Brassicaceae. Brazilian Journal of Biology, 77: 703–709.

KASER, J.M.; HEIMPEL, G.E. 2015. Linking risk and efficacy in biological control host-parasitoid models. Biological Control, 90: 49-60

KLETER, G.A.; UNSWORTH, J.B.; HARRIS, C.A., 2011. The impact of altered herbicide residues in transgenic herbicide-resistant crop on standard setting for herbicide residues. Pest Management Science, 67: 1193-1210.

KOGAN, M. 1998. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. Annual Review of Entomology, 43: 243-270.

LEITE, G.L.D.; PAULO, P.D.; ZANUNCIO, J.C.; TAVARES, W DE S; ALVARENGA, A.C.; DOURADO, L.R.; BISPO, E.P.R.; SOARES, M.A. 2016. Herbicide toxicity, selectivity and hormesis of nicosulfuron on 10 Trichogrammatidae (Hymenoptera) species parasitizing

(Lepidoptera: Pyralidae) eggs. Journal of Environmental Science and Health. Part B. Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 30: 1-7.

LIRA, A.C.S.; TEIXEIRA, V.W. ;DUTRA, K.A.; CUNHA, F.M.; SOUZA, L.M.; TEIXEIRA, A.C.A., 2019. Impact of zoophytophagy on chemical content of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed on leptopteran larvae and cotton leaves. Phytoparasitica, 47: 432-446.

MALAQUIAS, J.B., OMOTO, C., RAMALHO, F.S.; WESLEY, W. A. C.; SILVEIRA, R. F., 2015. Bt cotton and the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) in the management of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to lambda-cyhalothrin. Journal of Pest Science, 88: 57-63.

MENEZES, C.W.G.; SANTOS, J.B.; ASSIS JÚNIOR, S.L.; FONSECA, A.J.; FRANÇA, A.C.; SOARES, M.A.; FERNANDES, A.F. 2012. Seletividade de atrazine e nicosulfuron a *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Planta Daninha, 30: 327-334.

MENEZES, C.W.G.; SOARES, M.A. 2016. Impacts of the control of weeds and herbicides applied to natural enemies. Revista Brasileira de Herbicidas, 15: 2-13.

PALLET, K.E.; LITTLE, J.P.; SHEEKEYMAND VEERASAKARAN, P. 1998. The mode of action of isoxafutole: 1. Physiological effects, metabolism and selectivity. Pesticide Biochemistry and Physiology, 62: 113-124.

PIRES, E.M.; SOARES, M.A.; NOGUEIRA, R.M.; ZANUNCIO, J.C.; MOREIRA, P.S.A.; OLIVEIRA, M.A., 2015. Seven decades of studies with Asopinae predators in Brazil. Bioscience Journal, 31: 1530-1549.

PROCÓPIO, S.O.; FERNANDES, M.F.; TELES, D.A.; SENA FILHO, J.G.; CARGNELUTTI FILHO, A.; VARGAS, L., 2013. Tolerância da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus* a herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, 8: 610-617.

ROCHA, J.H.T.; PIETRO, M.R.; BORELLI, K.; BACKES, C.; NEVES, M.B. 2014. Produção e desenvolvimento de mudas de eucalipto em função de doses de fósforo. *Revista Ceres*, 19: 535-543.

ROMA, G. C.; BUENO, O. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. 2010. Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron*, 41: 395-401

SEAGRAVES, M. P. ; LUNDGREN, J. G. 2012. Effects of neonicotinoid seed treatments on soybean aphid and its natural enemies. *Journal of Pest Science*, 85: 125-132.

SOTO, A.; OLIVIERA, H. G.; BACCA, T. 2012. Morfología e histología del aparato reproductor de *Supputius cincticeps* (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). *Revista Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales Actualidad & Divulgación Científica*, 15: 117-123.

TOMASETTO, F.; TYLIANAKIS, M. R; WRATTEN, S.; GOLDSON, S. L., 2017. Intensified agriculture favors evolved resistance to biological control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114: 3885-3890.

TUFFI SANTOS, L.D.; CARDOSO FILHO, O.; SANTOS JÚNIOR, A.; SANT'ANNASANTOS, B.F.; FELIX, R.C.; LEITE, F.P. 2013. Floristic and structural variation of weeds in eucalyptus plantations as influenced by relief and time of year. *Planta Daninha*, 31: 491-499.

ZANUNCIO, J.C.; JUSSELINO-FILHO, P.; RIBEIRO, R.C.; ZANUNCIO, T.V.; RAMALHO, F.S.; SERRÃO, J.E. 2011. Hormetic responses of a stinkbug predator to sublethal doses of pyrethroid. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87: 608-614.

ZANUNCIO, J.C.; JUSSELINO-FILHO, P.; RIBEIRO, R.C.; CASTRO, A.A.; ZANUNCIO, T.V.; SERRÃO, J.E. 2013. Fertility and life expectancy of a predatory stinkbug to sublethal doses of a pyrethroid. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1: 39-45.

ZANUNCIO, J.C.; TAVARES, W.S.; FERNANDES, B.V.; WILCKEN, C.F.; ZANUNCIO, T.V. 2014. Production and use of Heteroptera predators for the biological control of *Eucalyptus* pests in Brazil. *Ekoloji*, 23: 98-104.

ZANUNCIO, J.C.; LACERDA, M.C.; ALCANTARA DE LA CRUZ, R.; BRÜGGER, B. P.; PEREIRA, A.I.A.; WILCKEN, C.F.; SERRÃO, J.E.; SEDIYAMA, C.S. 2018. Glyphosate-based herbicides toxicity on life history parameters of zoophytophagous *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 245-250.

CAPÍTULO I

IMPACTOS DO ISOXAFLUTOLE NA BIOLOGIA DE *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae).

RESUMO

No Brasil, os percevejos do gênero *Podisus* spp. são importantes agentes no controle biológico por terem ocorrência em ambientes naturais e ampla distribuição nos sistemas agroflorestais. Além de serem caracterizados pelo aspecto predatório, suplementam sua dieta extraindo seiva de vegetais. Por causa desse hábito podem estar sujeitos a ingerir agrotóxicos de caráter sistêmico utilizados no controle de plantas daninhas, como por exemplo, o Isoxaflutole. Os resultados de alguns estudos apontam que doses subletais de agrotóxicos podem alterar o comportamento e a capacidade reprodutiva dos organismos benéficos. Mesmo que os insetos envolvidos diretamente na exposição ao agrotóxico não manifestem nenhuma alteração significativa, os descendentes podem estar sendo afetados comprometendo sua viabilidade em ambientes naturais. No presente trabalho objetivou-se verificar os impactos do Isoxaflutole formulado comercial (Fordor®) e do ingrediente ativo na biologia reprodutiva e desenvolvimento de *Podisus nigrispinus*. Os resultados não demonstraram diferenças quanto aos parâmetros reprodutivos das fêmeas tratadas com o formulado comercial, quando comparado ao controle. Também não houve diferenças desses parâmetros para fêmeas dos tratamentos com o ingrediente ativo. Fêmeas tratadas com o formulado comercial produziram 23% mais ovos que aquelas do controle. Para as fêmeas do tratamento com o ingrediente ativo, observou-se que na maior concentração e na concentração igual à comercial houve um acréscimo no total de ovos de 20 e 10%, respectivamente, quando comparadas àquelas da menor concentração. Os resultados observados para as fases I, III e IV do desenvolvimento imaturo indicaram diferenças entre o formulado comercial e o controle, assim como as fases I, II e IV relacionadas ao ingrediente ativo. Esses resultados sugerem que o isoxaflutole pode influenciar hormônios relacionados à ovogênese e às mudanças dos estádios ninfais de *Podisus nigrispinus*, podendo afetar o *fitness* dessa espécie em seu ambiente natural.

Palavras-chave: Percevejos, Inimigo natural, Parâmetros reprodutivos

CHAPTER I

IMPACTS OF ISOXAFLUTOLE ON BIOLOGY OF *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae).

ABSTRACT

In Brazil, stinkbugs of the genus *Podisus* spp are important agents in biological control because they occur in natural environments and are widely distributed in agroforestry systems. In addition to being characterized by the predatory aspect, they supplement their diet by extracting vegetable sap. Because of this habit they may be subject to ingesting systemic pesticides used in weed control, such as Isoxaflutole. The results of some studies indicate that sublethal doses of pesticides may alter the behavior and reproductive capacity of beneficial organisms. Even though insects directly involved in pesticide exposure do not manifest any significant changes, offspring may be affected, compromising their viability in natural environments. The present work aimed to verify the impacts of the commercially formulated Isoxaflutole (Fordor®) and the active ingredient on the reproductive biology and development of *Podisus nigrispinus*. The results showed no differences regarding the reproductive parameters of females treated with the commercial formulation when compared to the control. There were also no differences of these parameters for females of treatments with the active ingredient. Females treated with the commercial formulation produced 23% more eggs than those of the control. For females treated with the active ingredient, it was observed that in the highest concentration and in the same concentration as the commercial one, there was an increase in the total eggs of 20 and 10%, respectively, when compared to those of the lowest concentration. The results observed for phases I, III and IV of immature development indicated differences between the commercial formulation and the control, as well as phases I, II and IV related to the active ingredient. These results suggest that isoxaflutole may influence hormones related to oogenesis and changes in the nymphal stages of *Podisus nigrispinus* and may affect the fitness of this species in its natural environment.

Keyword: Stinkbug, Natural enemy, Reproductive parameters

INTRODUÇÃO

Percevejos do gênero *Podisus* spp. são importantes agentes no controle biológico por terem ocorrência em ambientes naturais e ampla distribuição nos sistemas agroflorestais. Possuem hábito generalista alimentando-se primariamente de indivíduos imaturos de várias espécies de insetos, principalmente, da ordem Lepidoptera e Coleoptera (REIS et al., 2014). Além de serem caracterizados pelo aspecto predatório, suplementam sua dieta extraindo seiva de vegetais (HOLTZ et al., 2011). Por causa desse hábito, podem estar sujeitos a ingerir agrotóxicos de caráter sistêmico utilizados no controle de plantas daninhas, como por exemplo, o Isoxaflutole.

Estudos com interações entre os pesticidas utilizados e a seletividade destes em relação aos inimigos naturais são importantes para os programas de manejo integrado de pragas, uma vez que os efeitos negativos dos agrotóxicos podem reduzir ou mesmo dizimar populações de agentes de controle biológico (DE CASTRO et al., 2012; ZANUNCIO et al., 2011; LEITE et al., 2015; REIS et al., 2018; TORRES & BUENO, 2018). Entretanto, os resultados de alguns estudos apontam que doses subletais de agrotóxicos podem alterar o comportamento e a capacidade reprodutiva dos organismos benéficos, inferidos por meio da medição da resposta à exposição aos químicos e pela estimativa dos potenciais impactos nas gerações futuras (BAYRAM et al., 2010; ZANUNCIO et al., 2013; SPEAKMAN & GARRATT, 2014; LEITE et al., 2016). Mesmo que os insetos envolvidos diretamente na exposição ao agrotóxico não manifestem nenhuma alteração significativa, os descendentes podem estar sendo afetados significativamente, comprometendo sua viabilidade em ambientes naturais.

Nesse contexto, *Podisus nigrispinus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) é uma espécie importante nos programas de controle biológico, podendo ser uma peça crucial no manejo integrado de pragas como inimigo natural de insetos prejudiciais aos sistemas agroflorestais. Além disso, podem ser criados em laboratório usando presas alternativas, como o besouro da espécie *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) (DE BORTOLI et al., 2011; SOARES et al., 2011). Essa facilitação para criar o inseto garante que a espécie possa ser usada como um bom modelo experimental sobre os efeitos de agrotóxicos em organismos não alvos.

Em função dessas condições, mais experimentos devem ser conduzidos para melhor correlacionar os efeitos dos agrotóxicos ao potencial biótico de inimigos naturais, principalmente, de predadores Asopinae. Tais resultados poderão balizar as tomadas de decisão quanto à eficiência de inimigos naturais quando presentes ou liberados em ambientes que também receberão agrotóxicos para o controle químico.

Objetivou-se verificar os impactos do Isoxaflutole formulado comercial (Fordor[®]) e do ingrediente ativo deste produto na biologia reprodutiva e desenvolvimento de *P. nigrispinus*.

MATERIAL E MÉTODOS

OBTENÇÃO DE *Podisus nigrispinus*

Os espécimes de *P. nigrispinus* foram obtidos da criação do Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, alimentados com pupas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) *ad libitum*, em sala climatizada com temperatura variando entre 23 e 27 °C, umidade relativa entre 60 e 80% e fotofase de 12 horas.

BIOENSAIOS

Para a avaliação dos efeitos do herbicida foram conduzidos dois bioensaios. No primeiro utilizou-se o formulado comercial do herbicida Isoxaflutole (Fordor[®] 750 WG). No segundo bioensaio foi utilizado apenas o ingrediente ativo Isoxaflutole (Pestanal[®], Analytical Standard, Sigma-Aldrich/100mg).

TRATAMENTOS

Para o bioensaio com o formulado comercial utilizou-se dois tratamentos e cinco repetições em cada tratamento, em um total de 10 parcelas. O herbicida Isoxaflutole (Fordor[®] 750 WG) foi preparado na concentração recomendada pelo fabricante, 200g.ha⁻¹ (150g do i.a.), com 0,64g grânulos de herbicida por litro de água destilada. Os exemplares fêmeas de *P. nigrispinus* foram acondicionadas, individualmente, em potes plásticos de 500 ml contendo um tubo anestésico tipo odontológico e larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) *ad libitum*. O volume acondicionado no tubo foi de 1 ml. No tratamento controle foi usada apenas água destilada. Três dias após a contaminação, as fêmeas foram transferidas para potes contendo um macho recém-emergido da criação.

Para o bioensaio com o ingrediente ativo (i.a.) foram conduzidos três tratamentos, com cinco repetições por tratamento, em um total de 15 parcelas. Os exemplares fêmeas seguiram o mesmo protocolo do bioensaio descrito anteriormente. Em cada tratamento as soluções foram preparadas a partir de uma solução estoque com 31,5 mg do i.a. dissolvidos em 90 ml de água destilada, que equivalia a duas vezes a concentração do i.a. encontrado no formulado comercial,

ou seja, 400g.h^{-1} . Dessa maneira os tratamentos seguiram essa sequência: duas vezes a dose comercial, dose comercial (200g.h^{-1}) e metade da dose comercial (100g.h^{-1}).

Em todos os tratamentos foram avaliados o número total de posturas, número de ovos por fêmea, número de posturas e intervalo entre as posturas, número de ninfas eclodidas por postura e duração das fases do desenvolvimento imaturo. Cada casal foi acompanhado diariamente até a morte da fêmea, assim que as fêmeas morriam a repetição era finalizada e o macho descartado.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ESTATÍSTICA

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com os dados submetidos a testes das pressuposições do modelo matemático e comparados pelo teste T os resultados do bioensaio realizado com o Isoxaflutole (Fordor®) para amostras independentes a 1% de probabilidade. O teste de Tukey foi utilizado para os tratamentos do bioensaio com o ingrediente ativo (i.a.) Isoxaflutole para comparação das médias dos tratamentos a 1% e a 5% de significância.

RESULTADOS

CICLO DE VIDA DE *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae)

Não foram observadas diferenças pelo teste T a 5%, entre o controle e o tratamento por ingestão de Isoxaflutole (Fordor®) para nenhum dos resultados encontrados relativos aos parâmetros reprodutivos. Por outro lado, o número total de ovos produzidos indicou variação percentual, onde fêmeas expostas ao agrotóxico tiveram um incremento de 23% a mais de ovos do que aquelas do controle (Tabela I). Os parâmetros reprodutivos foram semelhantes pelo teste de Tukey a 1 e a 5% entre as médias dos tratamentos por ingestão do ingrediente ativo (i.a.). Os resultados desse bioensaio também indicaram uma variação no percentual de ovos entre os diferentes tratamentos, em que a maior concentração e a comercial produziram 20 e 10% a mais que a menor concentração, respectivamente (Tabela II).

Tabela I – Parâmetros reprodutivos (Média \pm erro padrão) de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae), relativa ao controle (água destilada) e à ingestão do herbicida Isoxaflutole (Fordor®) na concentração de 200g.h^{-1}

Variáveis	Controle	Isoxaflutole (Fordor®)
Pré-oviposição (Dias) ^{ns}	$5,33 \pm 0,33$	$3,00 \pm 1,00$

Oviposição (Dias) ^{ns}	9,33 ± 4,41	10,67 ± 2,33
Pós-oviposição (Dias) ^{ns}	2,00 ± 0,57	2,00 ± 0,00
Número total de Posturas ^{ns}	20	25
Nº Ovos por Postura ^{ns}	12,85 ± 1,69	16,44 ± 1,44
Nº total de Ovos ^{ns}	257	411
Período embrionário ^{ns}	5,00 ± 0,15	5,16 ± 0,20
Viabilidade dos Ovos ^{ns}	86,25 ± 5,55	69,84 ± 5,20
Longevidade das Fêmeas ^{ns}	16,67 ± 3,76	15,67 ± 3,28
Razão Sexual ^{ns}	0,47 ± 0,03	0,70 ± 0,16

(ns) Não significativo.

Tabela II – Parâmetros reprodutivos (Média ± erro padrão) de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae), exposto ao ingrediente ativo (i.a.) Isoxaflutole por ingestão, em três concentrações diferentes.

Variáveis	2x (400g.h ⁻¹)	Comercial (200g.h ⁻¹)	1/2(100g.h ⁻¹)
Pré-oviposição (Dias) ^{ns}	7,00 ± 0,56	6,40 ± 0,68	6,25 ± 0,48
Oviposição (Dias) ^{ns}	14,8 ± 3,38	9,25 ± 4,42	9,00 ± 2,55
Pós-oviposição (Dias) ^{ns}	2,00 ± 0,71	2,20 ± 1,02	1,50 ± 0,65
Número total de Posturas ^{ns}	48	34	27
Nº Ovos por Postura ^{ns}	18,12 ± 1,16	17,11 ± 3,17	19,88 ± 3,73
Nº total de Ovos ^{ns}	858	671	466
Período embrionário ^{ns}	3,75 ± 0,25	4,25 ± 0,48	4,33 ± 0,33
Viabilidade dos Ovos ^{ns}	47,81 ± 18,73	67,53 ± 8,16	36,57 ± 12,30
Longevidade das Fêmeas ^{ns}	21,40 ± 2,02	14,80 ± 4,49	14,20 ± 2,78

Razão Sexual ^{ns}	0,46 ± 0,05	0,52 ± 0,06	0,47 ± 0,08
----------------------------	-------------	-------------	-------------

(ns) Não significativo.

Os resultados observados para as fases de desenvolvimento do período imaturo indicaram diferenças entre o controle e o tratamento por ingestão de Isoxaflutole (Fordor[®]), nos estádios I, III e IV (Tabela III). Também foram encontradas diferenças nos tratamentos por ingestão do ingrediente ativo Isoxaflutole nos estágios I, II e IV, onde o tratamento com a maior concentração diferiu dos outros dois tratamentos no estágio I; no estágio II o tratamento com menor concentração diferiu do tratamento com a concentração comercial, mas não diferiu do tratamento com maior concentração; enquanto que no estágio IV o tratamento com concentração comercial diferiu dos outros dois tratamentos (Tabela IV).

Tabela III- Duração em dias (Média ± erro padrão) dos estádios I, II, III, IV e V e da fase ninfal de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) do controle (água destilada) e do tratamento por ingestão de Isoxaflutole (Fordor[®]), na concentração de 200g.h⁻¹.

Estádios	Duração (dias) Tratamentos	
	Controle	Isoxaflutole (Fordor [®])
I **	5,00 ± 0,00b	6,50 ± 3,40a
II ^{ns}	3,58 ± 0,08a	3,74 ± 0,21a
III**	3,66 ± 0,09b	6,36 ± 1,12a
IV**	3,94 ± 0,06b	5,16 ± 0,25a
V ^{ns}	2,57 ± 0,20a	3,40 ± 0,73a
Fase Ninfal**	18,75 ± 1,78b	25,16 ± 5,71 ^a

** significativo, teste T a 1%.

médias seguidas da mesma letra não diferem entre si para teste T.

Tabela IV - Duração em dias (Média ± erro padrão) dos estádios I, II, III, IV e V e da fase ninfal de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) dos tratamentos por ingestão do ingrediente ativo (i.a.) Isoxaflutole, em três concentrações diferentes.

Duração (dias) Tratamentos

Estádios	2x (400g.h ⁻¹)	Comercial (200g.h ⁻¹)	1/2 (100g.h ⁻¹)
I **	2,84 ± 0,16b	5,47 ± 0,13a	5,69 ± 0,15 ^a
II **	3,63 ± 0,15ab	4,09 ± 0,16a	2,93 ± 0,20b
III ^{ns}	5,35 ± 0,40	5,47 ± 0,20	4,23 ± 0,28
IV*	3,90 ± 0,25a	3,13 ± 0,15b	4,10 ± 0,28 ^a
V ^{ns}	2,44 ± 0,18	2,18 ± 0,18	2,69 ± 0,26
Fase Ninfal**	18,16 ± 1,14b	20,34 ± 0,82a	19,64 ± 1,17ab

** significativo, teste de Tukey a 1%.; * significativo, teste de Tukey a 5%.

médias seguidas da mesma letra não diferem entre si para teste de Tukey a 1%.

DISCUSSÃO

A utilização de agrotóxicos pode comprometer a atividade predatória de *P. nigrispinus* e também a capacidade de encontrar parceiros, afetando toda a dinâmica dessa espécie em ambientes naturais (OLIVEIRA *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2018). Além de interferir na etologia do organismo os agrotóxicos podem alterar as células germinativas, inviabilizando a produção dos gametas (LUNDGREN, 2011; DE CASTRO *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2018).

No presente trabalho, as fêmeas que receberam a dose da formulação comercial do Isoxaflutole (Fordor[®]) por ingestão, não apresentaram mudanças significativas nos parâmetros reprodutivos. Da mesma maneira, não foram verificadas alterações desses parâmetros nas fêmeas que fizeram ingestão das diferentes concentrações do ingrediente ativo Isoxaflutole, ou seja, essas substâncias não afetaram o *fitness* das fêmeas testadas (MENEZES *et al.* 2012; ZANUNCIO *et al.*, 2013). Entretanto as fêmeas tratadas com o formulado comercial produziram 23% mais ovos que o controle, e também fêmeas tratadas com a maior concentração e com concentração igual à comercial tiveram 20 e 10% mais ovos quando comparadas com aquelas tratadas com a menor concentração, respectivamente. Esses resultados indicam que o herbicida poderia afetar os padrões hormonais relacionados à ovogênese, tais como, a concentração do hormônio juvenil (JH). O JH está relacionado com o metabolismo geral, agindo no corpo dos insetos como um todo. Secretado pela glândula corpora allata (CA), este hormônio é essencial para a plena expressão da produção de ovos na maioria dos insetos adultos

(Davey, 2007). Assim, a molécula de Isoxaflutole poderia interagir com a CA, estimulando a produção de JH, em uma via bioquímica que ainda precisa ser elucidada.

Os resultados verificados para o desenvolvimento das fases imaturas indicam que resíduos do herbicida foram transferidos para a geração seguinte por meio dos ovócitos, afetando desse modo a duração de cada fase, como já observado em outros trabalhos correlacionando o uso de agrotóxicos e o *fitness* de inimigos naturais (ZANUNCIO *et al.*, 2013; MARTINOU *et al.*, 2014; WILLOW *et al.*, 2019).

As fases ninfais I, III e IV, foram mais longevas para o tratamento com o formulado comercial quando comparadas com o controle. O prolongamento das fases pode estar associado à ação tóxica causada pelos adjuvantes e aditivos que compõe o formulado comercial (Menezes & Soares, 2016).

Os resultados observados para o tratamento com o ingrediente ativo puro em três diferentes concentrações também indicaram um prolongamento das fases ninfais I, II e IV, quando comparadas às médias entre cada tratamento, e considerando que cada fase ninfal respondeu diferentemente a essas concentrações. O estágio I, por exemplo, foi mais susceptível à concentração igual a comercial e à metade da concentração comercial, prolongando o tempo médio nessas fases, enquanto que na maior concentração o tempo médio foi menor. Esse resultado pode indicar que concentrações maiores do i.a. influenciam positivamente essa fase do desenvolvimento, contribuindo com a redução do tempo médio da fase ninfal. No estágio II as diferenças encontradas demonstraram que o efeito do i.a. na menor concentração, reduziu o tempo médio nessa fase, comparando com o tempo médio nas outras concentrações. Por sua vez, as diferenças observadas no estágio IV, indicam que a concentração igual a comercial teve efeito positivo pois encurtou o tempo médio do desenvolvimento nessa fase.

As variações do tempo médio do desenvolvimento verificadas para os estádios I, II e IV e em diferentes concentrações do i.a. sugerem que essa substância química age modulando os hormônios que regulam as ecdises e a maturação até a fase adulta, uma vez que o desenvolvimento da fase imatura de insetos é regulado por hormônios (SHARMA *et al.*, 2018), considerando que cada um dos estádios do desenvolvimento imaturo foi influenciado em uma dada concentração e naquela fase específica. Não há dados na literatura que corroborem a hipótese de que agrotóxicos em diferentes concentrações afetem a fisiologia endócrina do inseto. Artigos com resultados correlacionando os efeitos de agrotóxicos no desenvolvimento das fases imaturas citam apenas a ação do hormônio Adipocinético (AKH) que responde à presença de substâncias associadas ao estresse oxidativo pela formação de espécies reativas de oxigênio (KODRIK *et al.*, 2015; KRŮČEK *et al.*, 2015)

Ainda assim, considera-se que qualquer prolongamento das fases do desenvolvimento imaturo pode comprometer o potencial biótico da espécie, porque os indivíduos ficariam mais expostos aos predadores desse grupo, podendo não conseguir atingir a fase adulta e se reproduzir. Além disso, com o estágio ninfal mais longo, será necessário mais recurso para manter os organismos. Outros trabalhos relacionando tipos de herbicida, como o atrazine, o nicosulfuron, o paraquat e o glifosate ao *fitness* reprodutivo de predadores Asopinae, demonstraram que doses subletais também não alteraram o padrão reprodutivo, mas afetaram a geração descendente daquela que foi exposta, mas em nenhum desses trabalhos discutiu-se a hipótese do agrotóxico ter efeito no metabolismo hormonal do inseto (ZANUNCIO *et al.*, 2011; CAMILO *et al.*, 2012; KRŮČEK *et al.*, 2015; MENEZES & SOARES, 2016; ZANUNCIO *et al.*, 2018).

No presente trabalho verificou-se que o herbicida Isoxaflutole, no formulado comercial, alongou o tempo das fases ninfais, enquanto o ingrediente ativo isolado, mesmo em baixas concentrações, afetou o desenvolvimento ninfal do predador *P. nigrispinus*, encurtando o tempo médio de determinados estádios. Esses resultados sugerem que o formulado comercial, por causa dos aditivos, afeta o ciclo dessa espécie tornando esses organismos mais susceptíveis em seu ambiente natural.

CONCLUSÃO

No tratamento por ingestão do formulado comercial, as fêmeas produziram 23 % mais ovos que as fêmeas do controle, enquanto que aquelas expostas ao ingrediente ativo na maior

concentração e na concentração comercial produziram 20 e 10% a mais de ovos, respectivamente, do que as fêmeas que ingeriram a menor concentração.

As fases imaturas dos descendentes da geração parental expostas ao contaminante foram afetadas porque, possivelmente, parte do herbicida foi transferido para os ovócitos pela geração parental. Em *P. nigrispinus* a rapidez na passagem de uma fase do desenvolvimento para outra é vital, pois quanto mais longa for uma determinada fase, mais estará sujeita à predação e mais recurso é necessário para manter o desenvolvimento do organismo.

As diferenças observadas para os estádios ninfais como resultado da exposição a diferentes concentrações do ingrediente ativo sugerem estudos mais minuciosos com cada estágio do desenvolvimento, objetivando-se verificar a hipótese de que essa substância na forma isolada pode afetar o controle hormonal nessa espécie e na formulação comercial pode apresentar elementos tóxicos.

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se afirmar que os descendentes da geração parental da espécie *P. nigrispinus*, exposta ao herbicida na formulação comercial, terão o potencial reprodutivo comprometido quando em contato com esse agrotóxico em seu ambiente natural. Adultos, porém, tem sua oviposição estimulada em até 20%.

REFERÊNCIAS

BAYRAM, A.; SALERNO, G.; ONOFRI, A.; CONTI, E. 2010. Sub-lethal effects of two pyrethroids on biological parameters and behavioral responses to host cues in the egg parasitoid *Telenomus busseolae*. *Biological Control*, 53: 153–160.

CAMILO, S.S.; SOARES, M.A.; DOS SANTOS, J.B.; DE ASSIS JÚNIOR, S.L.; FERREIRA, E.A.; MENEZES, C.W.G. 2012. Impactos toxicológicos de herbicidas recomendados para a cultura do milho em ninfas do predador *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Revista Brasileira de Herbicidas*, 11: 339-346.

DAVEY, K., 2007. The interaction of feeding and mating in the hormonal control of egg production in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*, 53: 208-215.

DE BORTOLI, S.A.; OTUKA, A.K.; VACARI, A.M.; MARTINS, M.I.E.G.; VOLPE H.X.L. 2011. Comparative biology and production costs of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) when fed different types of prey. *Biological Control*, 58: 127–132.

DE CASTRO, A.A.; LACERDA, M.C.; ZANUNCIO, T.V.; RAMALHO, F.S.; POLANCZYK, R.A. SERRÃO, J.E.; ZANUNCIO, J.C. 2012. Effect of the insect growth regulator diflubenzuron on the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Ecotoxicology*, 21: 96-103.

HOLTZ, A.M., ALMEIDA, G.D., FADINI, M.A.M., ZANUNCIO, J.C., ZANUNCIO-JÚNIOR, J.S.; ANDRADE, G.S. 2011. Phytophagy on eucalyptus plants increases the development and reproduction of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Acta Scientiarum: Agronomy*, 33: 231-235.

KODRÍK, D.; BEDNÁŘOVÁ, A.; ZEMANOVÁ, M.; KRISHNAN, N. 2015. Hormonal Regulation of Response to Oxidative Stress in Insects-An Update. *International Journal of Molecular Science*, 10: 25788-25816.

KRŮČEK, T.; KORANDOVÁ, M.; ŠERY, M.; FRYDRYCHOVÁ, R. Č. 2015. Effect of low doses of herbicide paraquat on antioxidant defense in *Drosophila*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 88: 235-248.

LEITE, G.L.D.; PAULO, P.D.; ZANUNCIO, J.C.; ALVARENGA, A.C.; SOARES, M.A.; TAVARES, W.S.; TUFFI-SANTOS, L.D.; SPINOLA FILHO, P.R.C. 2015. Effects of Atrazine-Based Herbicide on Emergence and Sex Ratio of Trichogrammatidae (Hymenoptera). Florida Entomologist, 98: 899-902.

LEITE, G.L.D.; PAULO, P.D.; ZANUNCIO, J.C.; TAVARES, W DE S; ALVARENGA, A.C.; DOURADO, L.R.; BISPO, E.P.R.; SOARES, M.A. 2016. Herbicide toxicity, selectivity and hormesis of nicosulfuron on 10 Trichogrammatidae (Hymenoptera) species parasitizing (Lepidoptera: Pyralidae) eggs. Journal of Environmental Science and Health. Part B. Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 30: 1-7.

LUNDGREN, J. G. 2011. Reproductive ecology of predaceous heteroptera. Biological Control, 59: 37-52.

MARTINOU, A.F.; SERAPHIDES, N.; STAVRINIDES, M.C. 2014. Lethal and behavioral effects of pesticides on the insect predator *Macrolophus pygmaeus*. Chemosphere, 96: 167-173.

MENEZES, C.W.G.; SOARES, M.A. 2016. Impacts of the control of weeds and herbicides applied to natural enemies. Revista Brasileira de Herbicidas, 15: 2-13.

MENEZES, C.W.G.; SANTOS, J.B.; ASSIS JÚNIOR, S.L.; FONSECA, A.J.; FRANÇA, A.C.; SOARES, M.A.; FERNANDES, A.F. 2012. Seletividade de atrazine e nicosulfuron a *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Planta Daninha, 30: 327-334.

OLIVEIRA, S. O. D.; BARBOSA, W. F.; MALQUI, K. S. V.; GUEDES, R. N. C. 2012. Mating behavior of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) under exposure to neem. Chilean Journal of Agricultural Research, 72: 523-527.

REIS, T.C.; SOARES, M.A.; DOS SANTOS, J.B.; DOS SANTOS, C.A.; SERRÃO, J.E.; ZANUNCIO, J.C.; FERREIRA, E.A., 2018. Atrazine and nicosulfuron affect the reproductive fitness of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). Anais da Academia Brasileira de Ciências, 90: 1-9.

SHARMA, A.; JHA, P.; REDDY, G. V. P. 2018. Multidimensional relationships of herbicides with insect-crop food webs. *Science of the Total Environment*, 643: 1522-1532.

SOARES, M.A.; BATISTA, J.D.; ZANUNCIO, J.C.; LINO-NETO, J.; SERRÃO, J.E. 2011. Ovary development, egg production and oviposition for mated and virgin females of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33: 597-602.

SPEAKMAN, J. R.; GARRATT, M. 2014. Oxidative stress as a cost of reproduction: beyond the simplistic trade-off model. *Bioessays*, 36: 93–106.

TORRES, J.B.; BUENO, A.F. 2018. Conservation biological control using selective insecticides – A valuable tool for IPM. *Biological Control*, 126: 53-64.

WILLOW, J.; SILVA, A.; VEROMANN, E.; SMAGGHE, G. 2019. Acute effect of low-dose thiacloprid exposure synergized by tebuconazole in a parasitoid wasp. *PLoS ONE*, 14: 1-13.

ZANUNCIO, J.C.; JUSSELINO-FILHO, P.; RIBEIRO, R.C.; ZANUNCIO, T.V.; RAMALHO, F.S.; SERRÃO, J.E., 2011. Hormetic responses of a stinkbug predator to sublethal doses of pyrethroid. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87: 608-614.

ZANUNCIO, J.C.; JUSSELINO-FILHO, P.; RIBEIRO, R.C.; CASTRO, A.A.; ZANUNCIO, T.V.; SERRÃO, J.E. 2013. Fertility and life expectancy of a predatory stinkbug to sublethal doses of a pyrethroid. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90: 39-45.

ZANUNCIO, J.C.; LACERDA, M.C.; ALCANTARA DE LA CRUZ, R.; BRÜGGER, B. P.; PEREIRA, A.I.A.; WILCKEN, C.F.; SERRÃO, J.E.; SEDIYAMA, C.S. 2018. Glyphosate-based herbicides toxicity on life history parameters of zoophytophagous *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 245-250.

CAPITULO II

IMPACTOS DO ISOXAFLUTOLE NA HEMOLINFA E NO CORPO GORDUROSO DE *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae)

RESUMO

A hemolinfa é o meio circundante que preenche a hemocele, transportando nutrientes por todo o corpo. Contêm diversos tipos de células, os hemócitos, categorizados por suas diferentes formas e funções. A densidade de hemócitos na hemolinfa varia durante o desenvolvimento do inseto, e também à presença de patógenos e substâncias químicas. Quando expostos aos agrotóxicos, por exemplo, insetos apresentam uma significativa alta na densidade de hemócitos. Além da hemolinfa a biologia do corpo gorduroso tornou-se uma área importante na entomologia e cresceu rapidamente na última década. Esse tecido apresenta muitas funções, as quais mudam conforme o progresso do desenvolvimento em insetos, atuando na regulação da embriogênese e metamorfose, mobilizando proteínas e lipídeos. Também é importante no sucesso reprodutivo das fêmeas, pois sintetiza e secreta vitelogenina para a maturação dos ovócitos e é importante na destoxificação das substâncias. O corpo gorduroso possui células características como os adipócitos ou trofócitos e os oenócitos. No presente trabalho, verificaram-se os efeitos do isoxaflutole em *P. nigrispinus*, utilizando-se o formulado comercial (Fordor®) e o ingrediente ativo (i.a.) por meio do estudo morfológico e histológico do corpo gorduroso além do estudo citológico da hemolinfa. Para os exemplares tratados com o formulado comercial e com o i.a. observou-se mudanças no número e tipos de hemócitos. Essas mudanças foram mais acentuadas conforme a concentração do i.a. aumentou. A morfologia do corpo gorduroso também apresentou mudanças após três dias da contaminação, tanto pela exposição ao formulado comercial quanto ao ingrediente ativo puro nas três concentrações, com aparente redução do volume total e do número de vesículas. Conforme as concentrações foram diminuindo e o tempo após a contaminação foi aumentando, o corpo gorduroso recuperou sua condição similar ao controle.

Palavras-chave: Agrotóxicos, Destoxificação, Hemócitos

CHAPTER II

IMPACTS OF ISOXAFLUTOLE ON HEMOLYMPH AND FAT BODY OF *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae).

ABSTRACT

Hemolymph is a surrounding medium that fills the hemocoel. They contain various cell types, the hemocytes, categorized by their different forms and functions. The hemolymph density in hemolymph varies during insect development, as well as the presence of pathogens and chemicals. When exposed to pesticides, for example, insects show a significant increase in hemocyte density. In addition to hemolymph fat body biology has become an important area in entomology and has grown rapidly in the last decade. This tissue has many functions which change as development progresses in insects, acting on the regulation of embryogenesis and metamorphosis by mobilizing proteins and lipids. It is also important in the reproductive success of females, as it synthesizes and secretes vitellogenin for oocyte maturation and important in detoxification of the substances. The fat body has characteristic cells such as adipocytes or trophocytes and oenocytes. In the present work, the effects of isoxaflutole on *P. nigrispinus* were verified, using the commercial formulation (Fordor®) and the active ingredient (i.a.) through the morphological and histological study of the fat body and the cytological study of hemolymph. For specimens treated with the commercial formulation and with i.a. changes in number and types of hemocytes were observed. These changes were more pronounced as i.a. concentration increased. Fat body morphology also changed after three days of contamination, both by exposure to the commercial formulation and the pure active ingredient at the three different concentrations, with apparent reduction in total volume and number of vesicles. As concentrations decreased and time after contamination increased, the fat body recovered its condition similar to the control.

Keyword: Pesticides, Detoxification, Hemocytes,

INTRODUÇÃO

A hemolinfa é o meio circundante que preenche a hemocoel, transportando nutrientes por todo o corpo. Também contém diversos tipos de células, os hemócitos, categorizados por suas diferentes formas e funções, incluindo os granulócitos, plasmatócitos e prohemócitos, sendo reconhecidos pelo menos mais cinco tipos (BROWNE *et al.*, 2013). Entretanto, a maioria dos insetos não possuem todos os tipos de hemócitos e, especificamente, para os hemípteros

são considerados de quatro a seis morfotipos conforme a subfamília (SIDDIQUI & AL-KHALIFA, 2012). Essas células são encontradas circulando livremente na hemolinfa e também aderidas aos órgãos e tecidos internos, como o corpo gorduroso e o trato digestório (ROSALES, 2017).

A densidade de hemócitos na hemolinfa varia durante o desenvolvimento do inseto, da fase juvenil à fase adulta, e também à presença de patógenos e substâncias químicas. Insetos quando expostos aos agrotóxicos, por exemplo, apresentam uma significativa alta na densidade de hemócitos (JAMES & XU, 2012; PANDEY & TIWARI, 2012). Essas células são ativadas a responder por meio da fagocitose neutralizando os agentes estranhos via sistema enzimático (KINGSOLVER *et al.*, 2013).

A biologia do corpo gorduroso tornou-se uma área importante na entomologia e que cresceu rapidamente na última década. Por consequência, esses estudos levaram a um significativo progresso na compreensão do metabolismo de insetos. Com origem a partir da mesoderme, esse tecido apresenta muitas funções, as quais mudam conforme o progresso do desenvolvimento em insetos. Estudos apontam o papel fisiológico na regulação da embriogênese e metamorfose mobilizando proteínas e lipídeos que são estocados na fase larval (PASCINI *et al.*, 2011). A morfologia do corpo gorduroso é determinada pelo tipo e pela quantidade de recursos consumidos pelo inseto, e parece também ser influenciada pelo estresse ambiental como a falta de alimento. É essencial ao metabolismo energético para musculatura do voo, por meio de glicogênio e triglicerídeos. Também é importante no sucesso reprodutivo das fêmeas, pois sintetiza e secreta vitelogenina para a maturação dos ovócitos (LI *et al.*, 2019; TURGAY-IZZETOĞLU & GÜLMEZ, 2019).

Além dessas funções, atua como um local para a resposta imunológica inata, induzindo a expressão de moléculas efetoras. Essas vias são evolutivamente conservadas em insetos e particularmente importantes para a imunidade inata (MUSSABEKOVA *et al.*, 2017). Por meio desse tecido, esses organismos também metabolizam substâncias que, se não forem neutralizadas, poderão comprometer a fisiologia e o comportamento. O processo de destoxificação ocorre em três fases sequenciais, por biotransformação, metabolização e excreção desses compostos, principalmente de agrotóxicos (ARRESE & SOULAGES, 2010; GRUENBERGER-BIRNER *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2013; ZHANG & XI, 2014).

Nesse contexto, considera-se o corpo gorduroso um centro de intercâmbio na regulação do desenvolvimento e comportamento associado a uma rede múltipla de sinais hormonais, nutricionais e ambientais, permitindo a integração de todo o organismo. Tal mecanismo é possível graças à liberação de moléculas pertencentes a uma família de proteínas

conhecidas como “sinalizadores do corpo gorduroso” (FBS) (ZHENG *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2019).

Os adipócitos ou trofócitos são células características do corpo gorduroso, armazenam lipídeos na forma de gotículas citoplasmáticas, e aparecem nos diferentes estágios do desenvolvimento dos insetos (CHAVES *et al.*, 2011; COSTA-LEONARDO *et al.*, 2013; ZHANG & XI, 2014). Ainda podem ser observados os oenócitos, encontrados entre os adipócitos. Enquanto aquelas células são provenientes do tecido mesenquimal, essas são originadas no ectoderma, podendo ser encontradas na epiderme associadas à síntese de hidrocarbonetos essenciais à impermeabilização do exoesqueleto, e também à produção de ácidos graxos de cadeia longa quando associadas aos trofócitos (ROMA *et al.*, 2010; BURNS *et al.*, 2012; MARTINS & RAMALHO-ORTIGÃO, 2012; MAKKI *et al.*, 2014). No presente trabalho, verificaram-se os efeitos do isoxaflutole em *P. nigrispinus*, utilizando-se o formulado comercial (Fordor®) e o ingrediente ativo (i.a.), por meio do estudo citológico da hemolinfa, em função do seu papel na circulação de nutrientes e nos processos de imunidade inata, e histológico do corpo gorduroso, devido a sua importância metabólica para o desenvolvimento, diferenciação celular e detoxificação de substâncias

MATERIAL E MÉTODOS

OBTENÇÃO DE *Podisus nigrispinus*

Os espécimes de *P. nigrispinus* foram obtidos da criação do Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, alimentados com pupas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) *ad libitum*, em sala climatizada com temperatura variando entre 23 e 27 °C, umidade relativa entre 60 e 80% e fotofase de 12 horas.

BIOENSAIOS

Para testar os efeitos do herbicida foram conduzidos dois bioensaios. No primeiro, utilizou-se o formulado comercial do herbicida Isoxaflutole (Fordor® 750 WG). No segundo bioensaio foi utilizado apenas o ingrediente ativo Isoxaflutole (Pestanal®, Analytical Standard, Sigma-Aldrich/100mg).

TRATAMENTOS

Para a avaliação dos efeitos cito/histológicos do herbicida, 10 tratamentos foram conduzidos com nove repetições em cada tratamento, no total de 90 parcelas.

Em quatro tratamentos utilizou-se o formulado comercial (Fordor[®]), que foi preparado na concentração recomendada pelo fabricante, 200 g.ha⁻¹ (150g do i.a.). Desses quatro tratamentos, dois foram por ingestão, contendo ou não o herbicida no tubo anestésico e dois foram por pulverização, também contendo ou não o herbicida.

Para o bioensaio com o ingrediente ativo (i.a.) Isoxaflutole, seis tratamentos foram realizados, três por ingestão e três por pulverização. Em cada tratamento as soluções foram preparadas a partir de uma solução estoque com 31,5 mg do i.a. dissolvidos em 90 ml de água destilada, que equivalia a duas vezes a concentração do i.a. encontrado no formulado comercial. Dessa maneira os tratamentos seguiram essa sequência: duas vezes a dose comercial; igual à dose comercial e metade da dose comercial.

Para todos os tratamentos desses bioensaios, o volume pulverizado foi de 1 ml, utilizando-se para isso uma seringa modificada com a ponta da agulha dobrada para que a solução fosse dispersa homogeneamente e em forma de leque. O mesmo volume foi acondicionado nos tubos anestésicos tipo odontológico. Nos tratamentos controle foi utilizada apenas água destilada.

Os exemplares fêmeas de *P. nigrispinus* foram acondicionados, individualmente, em potes plásticos de 500 ml contendo um tubo anestésico e como alimento, larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) *ad libitum*. Após três dias da contaminação com o herbicida, as soluções foram substituídas por água destilada em todos os tratamentos e repetições. A partir desse procedimento, 12 fêmeas foram retiradas, três de cada tratamento com o formulado comercial (Fordor[®]) e 18 fêmeas do bioensaio com o ingrediente ativo, três de cada tratamento. Esses procedimentos foram repetidos após seis dias da contaminação e também nove dias após a contaminação. Objetivou-se com isso, avaliar a possibilidade de os insetos estarem destoxificando o herbicida.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS EM NÍVEL MORFOLÓGICO E CITOISTOLÓGICO DE FÊMEAS DE *Podisus nigrispinus*.

A cada intervalo de três dias, 12 fêmeas, três de cada tratamento com o formulado comercial e 18, três de cada tratamento com o ingrediente ativo, foram retiradas e levadas para

o Laboratório de Biologia Celular, no Departamento de Ciências Biológicas na Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde (DCBio/FCBS) da UFVJM, onde foram crio-anestesiadas a -18° C, por cinco minutos. Retirou-se a hemolinfa por meio de punção com agulha na região do abdome das fêmeas após injeção de 110 µL de EDTA mais solução salina para insetos. A aplicação prévia do EDTA impediu aglutinação de células da hemolinfa. Além disso, essa solução manteve a cavidade do inseto túrgida. Em seguida com a mesma seringa retirou-se o conteúdo líquido transferindo-o para um fixador.

Toda a porção do exoesqueleto quitinoso foi levantada fazendo-se uma incisão com uma tesoura nas laterais do abdome, a fim de expor a cavidade do inseto. Com auxílio de uma pinça entomológica, foram retirados o intestino médio e corpos gordurosos visceral e parietal. Em seguida, estes foram fixados em solução de Glutaraldeído a 2,5% em solução tampão Fosfato de Sódio a 0,1M, e também em solução de Bouin (McMANUS & MOWRY, 1960), acondicionados em tubos Eppendorf e armazenados em geladeira a 12°C.

Com uma micropipeta aplicou-se 10 µL de hemolinfa em lâmina de vidro, feito o movimento de esfregão com outra lâmina a 45° e posta para secar ao ar livre. Após 15 minutos, foram adicionadas soluções de Eosina e de Azul de Toluidina, postas para secar e em seguida examinadas ao fotomicroscópio Primo Star Zeiss e fotografadas com câmera Axiocam ERc5s acoplada a esse equipamento.

Para a confecção das lâminas histológicas do corpo gorduroso, o material foi desidratado em série alcoólica crescente (70, 80, 90, 95 e 100%). Em seguida foram incluídos em parafina após receberem três banhos de Xilol. Foram obtidas secções histológicas com 5µm de espessura em micrótomo Lupetec MRP09. Os cortes foram montados, corados com hematoxilina e eosina (H. E.), e examinados em fotomicroscópio Primo Star Zeiss. As áreas que serviram de interesse para esse estudo foram fotografadas com câmera Axiocam ERc5s acoplada ao microscópio.

RESULTADOS

MORFOLOGIA E CITOISTOLOGIA DA HEMOLINFA DE *P. nigrispinus*.

Em fêmeas de *P. nigrispinus* observou-se mudanças no número e tipos de hemócitos, com presença abundante de prohemócitos (Ph), granulócitos (G) e plasmatócitos (Pl), naqueles

exemplares que foram tratados com o formulado comercial Isoxaflutole (Fordor[®]), tanto por ingestão quanto por pulverização, quando comparados com o grupo controle (Figuras 1, a, b, c e d). Para os exemplares fêmeas tratados com o ingrediente ativo Isoxaflutole, também observou-se mudanças no número e tipos de hemócitos quando comparadas as amostras entre os dois bioensaios, tanto por ingestão quanto por pulverização. Os tipos celulares variaram conforme a concentração do ingrediente ativo, com mais prohemócitos por campo quando a concentração foi maior, considerando o tratamento com ingestão do ingrediente ativo (Figura 2, a). Os tratamentos por pulverização do ingrediente ativo resultaram em um menor número de hemócitos, por campo, em todas as três concentrações testadas, e quanto mais diluída foi a dose, menos hemócitos por campo (Figura 2, f).

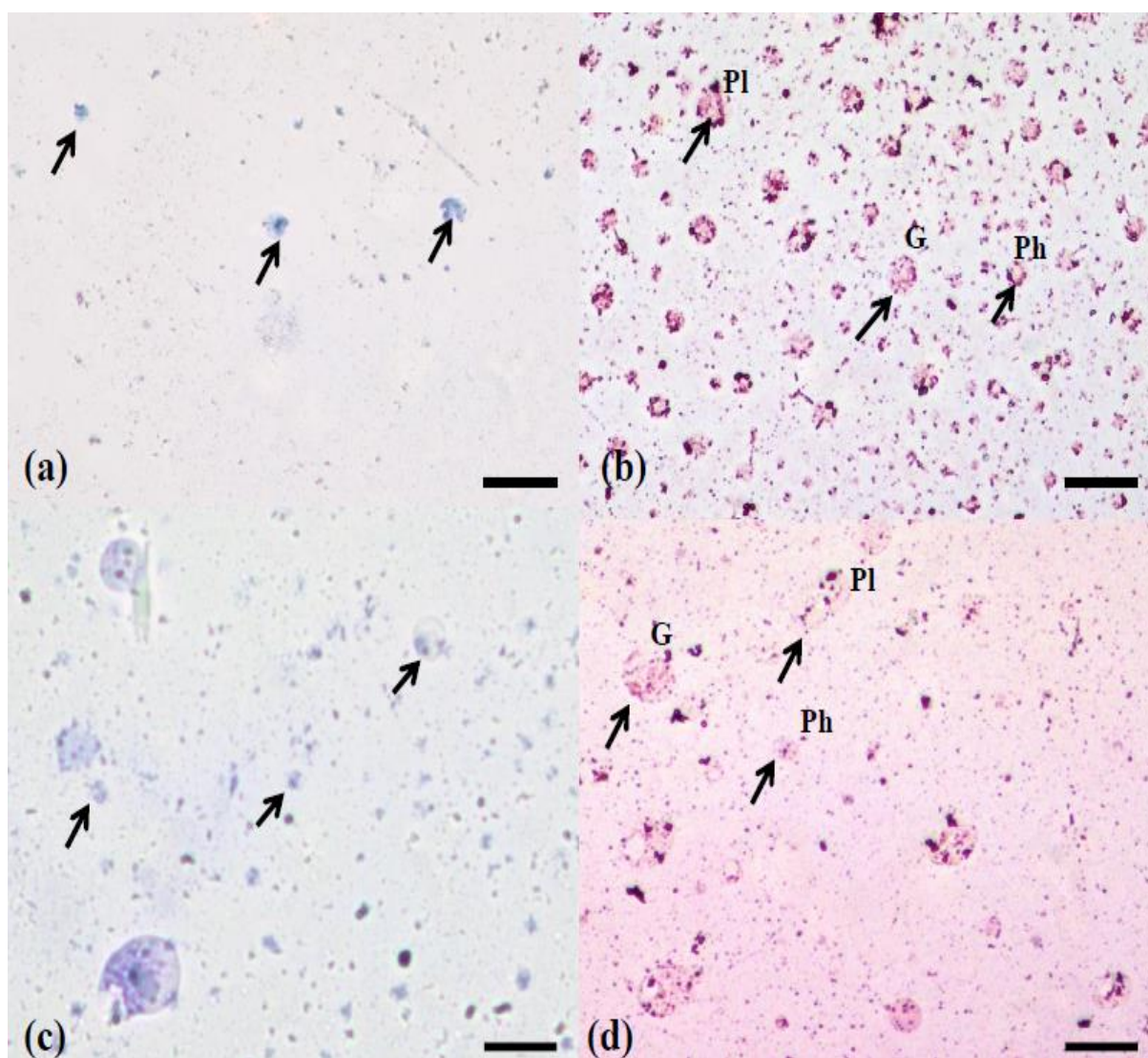


Figura 1 - Microscopia óptica da hemolinfa de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fêmeas. (a) e (c) tratamento controle por ingestão e pulverização, respectivamente; (b) e (d) tratamento com formulado comercial Isoxaflutole (Fordor[®]) por ingestão e pulverização, respectivamente, três dias após a contaminação. Hemócitos (setas); G (granulócitos); Ph (prohemócitos); Pl (plasmatócitos). Coloração: (a) e (c) Azul de Toluidina; (b) e (d) Eosina. Barra Escala = 10 µm.

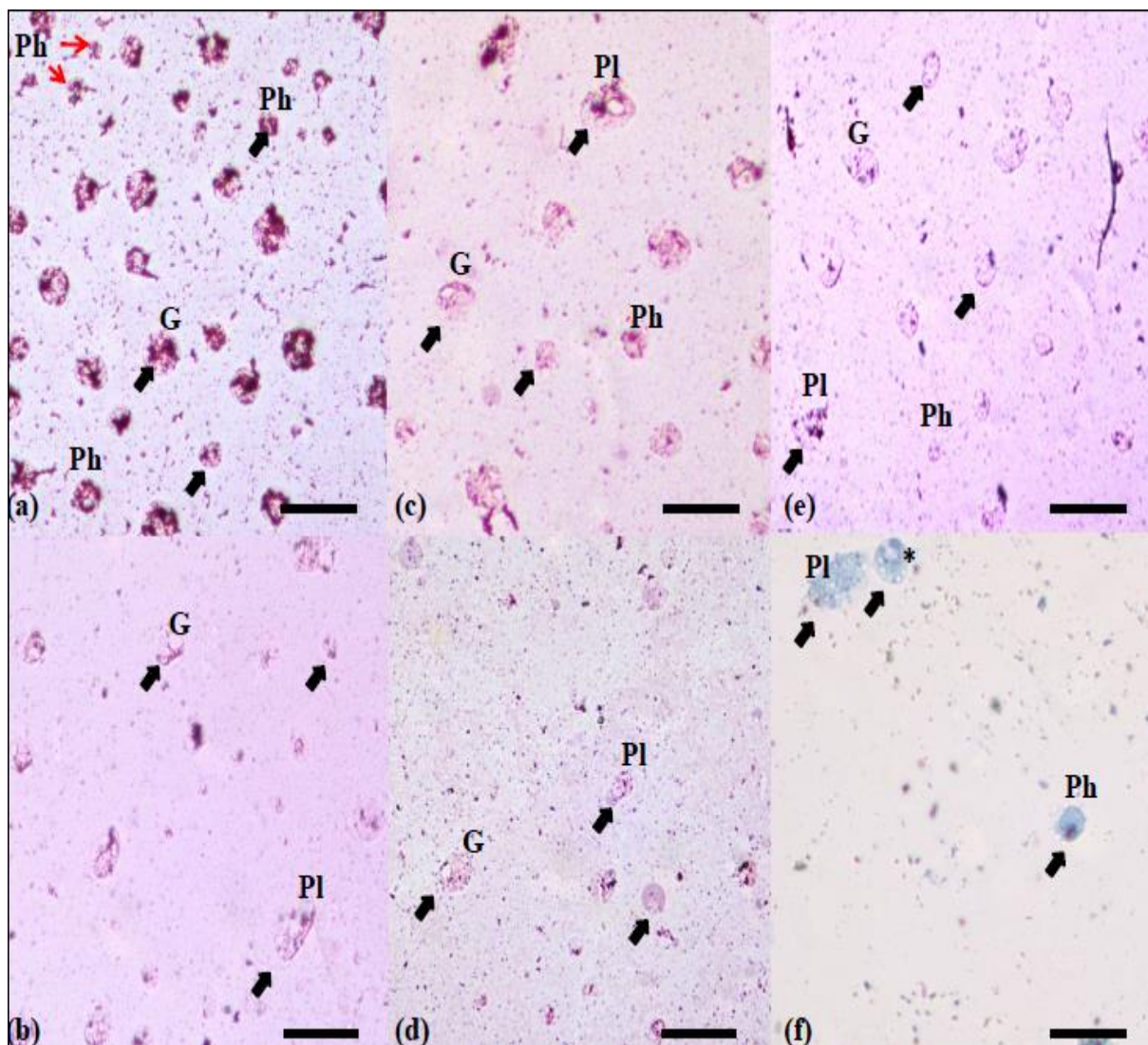


Figura 2 – Microscopia óptica da hemolinfa de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera:Pentatomidae) fêmeas, tratamento com ingrediente ativo na concentração maior que a comercial, por ingestão (a) e por pulverização (b); na concentração igual a comercial por ingestão (c) e por pulverização (d) e na concentração menor que a comercial, por ingestão (e) e por pulverização (f). Hemócitos (setas); G (granulócitos); Ph (prohemócitos); Pl (plasmatócitos); Oenocitóide (asterisco). Coloração: Eosina e Azul de Toluidina. Barra Escala = 10 μm.

MORFOLOGIA E CITOISTOLOGIA DO CORPO GORDUROSO DE *P. nigrispinus*.

O corpo gorduroso das fêmeas submetidas ao tratamento por ingestão e por pulverização do formulado comercial Isoxaflutole (Fordor[®]), três dias após a contaminação, apresentou-se, morfológicamente, com volume aparente menor e com o citoplasma dos trofócitos mais intensamente corado, menos vesiculoso, e enócitos evidentes (Figura 3, b e d), quando comparado com o corpo gorduroso das fêmeas do tratamento controle (Figura 3, a e c), assim como o número e tamanho das vesículas. Tanto no tratamento por pulverização quanto por ingestão observam-se os lóbulos do tecido com margens bem irregulares.

Os resultados também demonstraram alterações morfológicas no corpo gorduroso de fêmeas seis dias após a contaminação, com o tecido ainda caracterizado pela coloração mais acentuada do citoplasma dos trofócitos, núcleos de enócitos evidentes, mas com um aumento no número e tamanho das vesículas (Figura 4, e e g), quando comparados com o corpo gorduroso das fêmeas do tratamento anterior.

Para os resultados observados no corpo gorduroso das fêmeas nove dias após a contaminação, o padrão histológico diferiu em relação aos anteriores. O tecido apresentou-se mais volumoso, com um número maior de vesículas, citoplasma dos trofócitos menos corado e enócitos menos evidentes, assemelhando-se ao corpo gorduroso das fêmeas do tratamento controle (Figura 4, f e h). Observa-se, também, que as margens dos lóbulos do tecido apresentam-se com menos irregularidades.

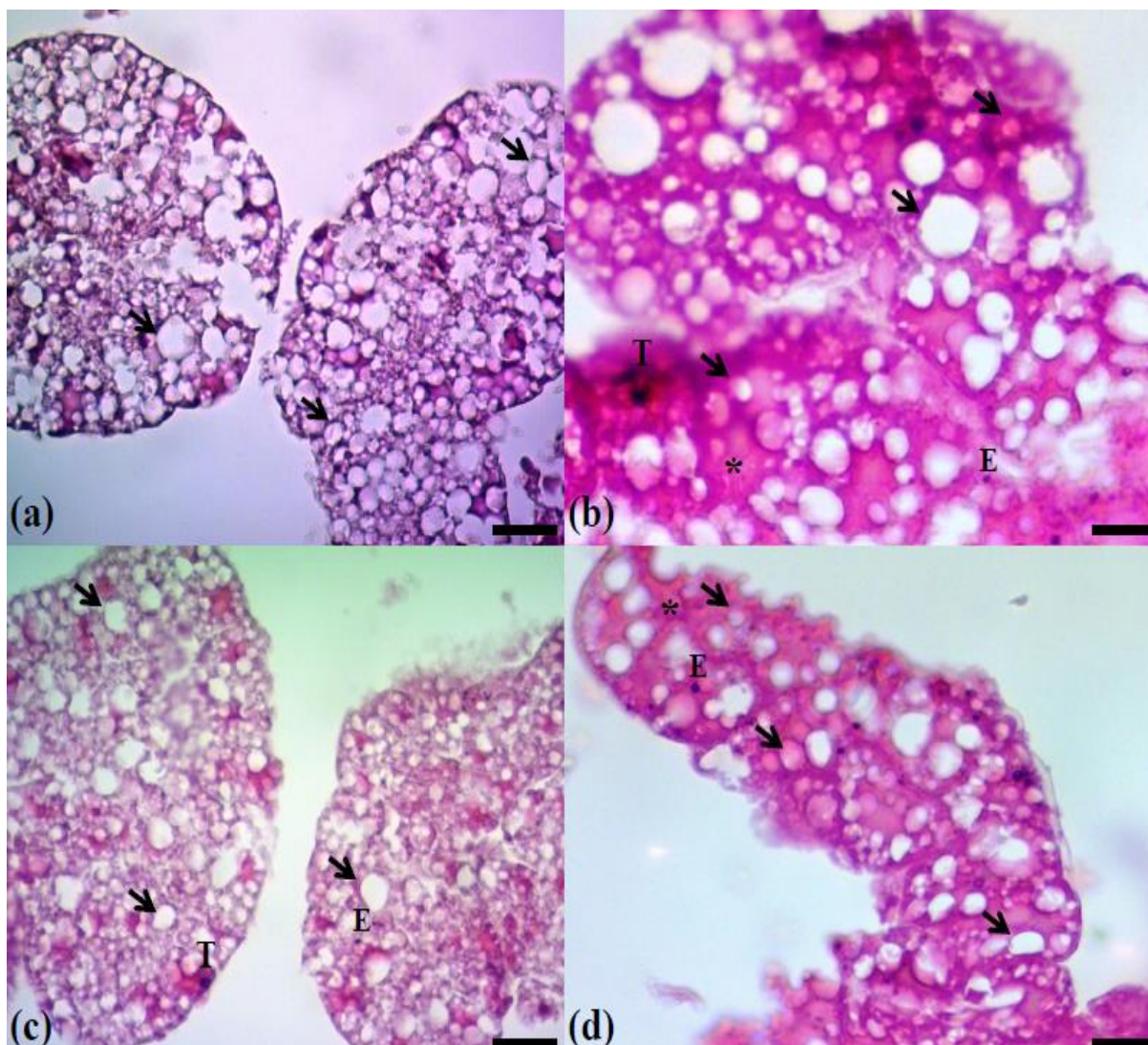


Figura 3 – Microscopia óptica do corpo gorduroso de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fêmeas, três dias após a contaminação: (a) e (c), tratamentos controle por ingestão e pulverização, respectivamente; (b) e (d), tratamentos com formulado comercial Isoxaflutole (Fordor®) por ingestão e pulverização, respectivamente. Vesículas (setas); T (trofócitos); E (enócitos); Citoplasma do Trofócito (asterisco). Coloração: H. E. Barra Escala = 50 μm.

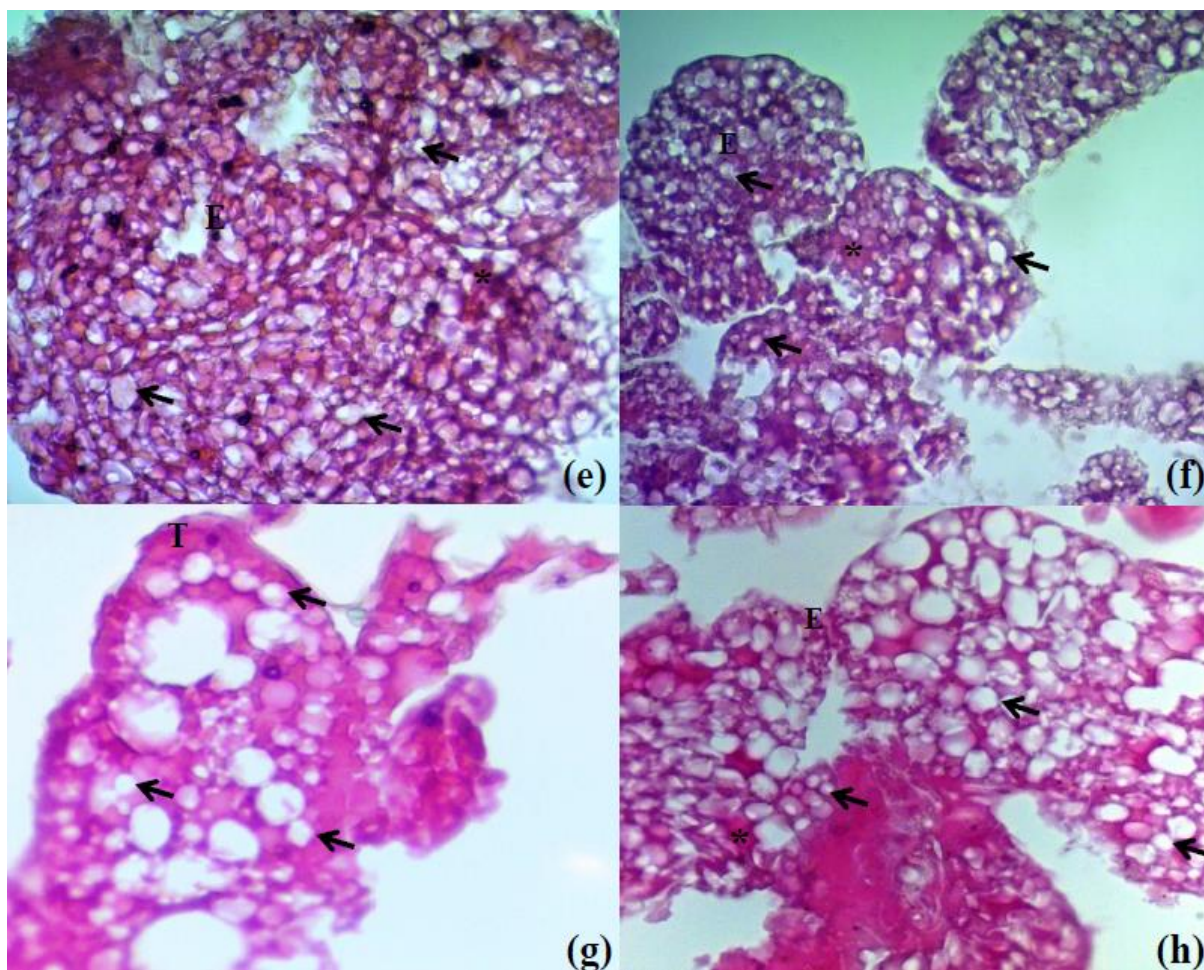


Figura 4 – Microscopia óptica do corpo gorduroso de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae), fêmeas: (e) e (g) seis dias após a contaminação com Isoxaflutole por ingestão e pulverização, respectivamente; (f) e (h) nove dias após a contaminação com Isoxaflutole por ingestão e pulverização, respectivamente. Vesículas (setas); Citoplasma dos trofócitos (asterisco); T (trofócitos); E (enócitos). Coloração: H. E. Barra Escala = 50µm.

O corpo gorduroso de fêmeas de *P. nigrispinus* tratadas com o ingrediente ativo Isoxaflutole, mostrou diferenças morfológicas quando comparados os resultados dos tratamentos por ingestão e por pulverização. Os tecidos apresentaram-se mais corados e com um número menor de vesículas para o tratamento por ingestão do ingrediente ativo, diferindo do resultado morfológico do tratamento por pulverização (Figuras 5, 6, 7). O corpo gorduroso do tratamento por ingestão com maior concentração do ingrediente ativo, três dias após a contaminação, mostrou-se menos volumoso, com citoplasma dos trofócitos mais intensamente corados e núcleo em evidência, vesículas menores em tamanho e número, presença de enócitos. Por sua vez, o corpo gorduroso do tratamento por pulverização mostrou uma abundância de

vesículas, que variaram em número e tamanho, citoplasma dos trofócitos menos corados e mais vesiculoso com núcleos menos evidentes e enócitos esparsos (Figura 5, a e c).

Os resultados observados para os tratamentos com concentração do ingrediente ativo igual à comercial, três dias após a contaminação, mostraram diferenças morfológicas. Por ingestão, o corpo gorduroso mostrou-se bem corado e com vesículas grandes muito vacuolizadas. Citoplasma e núcleo dos trofócitos bem evidentes, enquanto que o corpo gorduroso do tratamento por pulverização mostrou semelhança morfológica com o corpo gorduroso do tratamento anterior, ou seja, vesiculoso e com núcleos de trofócitos e enócitos menos evidentes (Figura 6, e e g). Na menor concentração do ingrediente ativo, três dias após a contaminação, os aspectos morfológicos do corpo gorduroso do tratamento por ingestão e por pulverização apresentaram diferenças bem evidentes, similares aos tratamentos anteriores. Por ingestão o tecido apresentou-se mais corado, poucas vesículas, mas grandes e vacuolizadas, núcleo e citoplasma de trofócitos e enócitos em evidência. O tecido resultante do tratamento por pulverização apresentou-se mais volumoso, mais vesiculoso, ou seja, vesículas menores e mais abundantes, com núcleo e citoplasma de trofócitos e enócitos menos evidentes (Figura 7, i e l).

Para o tratamento com a maior concentração do ingrediente ativo, seis dias após a contaminação, os resultados demonstraram variação morfológica entre o tecido resultante da ingestão comparado com a pulverização. Aquele mostrou um aumento relativo do volume, se comparado com as mesmas condições dos tratamentos anteriores. Maior número de vesículas e espaço intervesicular menos corado. Poucos núcleos de trofócitos, e enócitos em evidência. Por pulverização o tecido apresentou muitas vesículas, pouca evidência de citoplasma e núcleo de trofócitos e enócitos (Figura 5, b e d). Os resultados observados para o tratamento com ingrediente ativo na concentração igual a comercial, seis dias após a contaminação, demonstraram um tecido mais volumoso, com muitas vesículas, pouca evidência de núcleo e citoplasma de trofócitos e enócitos, mas ainda com coloração intensa, quando comparado com o resultado daquele por pulverização (Figura 6, f e h).

Os resultados obtidos do tratamento por ingestão e pulverização da menor concentração do ingrediente ativo, seis dias após a contaminação, indicaram poucas diferenças entre aquele derivado da ingestão quando comparado com o derivado da pulverização, ou seja, aumento do número de vesículas, menor evidência de núcleo e citoplasma de trofócitos e enócitos (Figura 7, j e m).

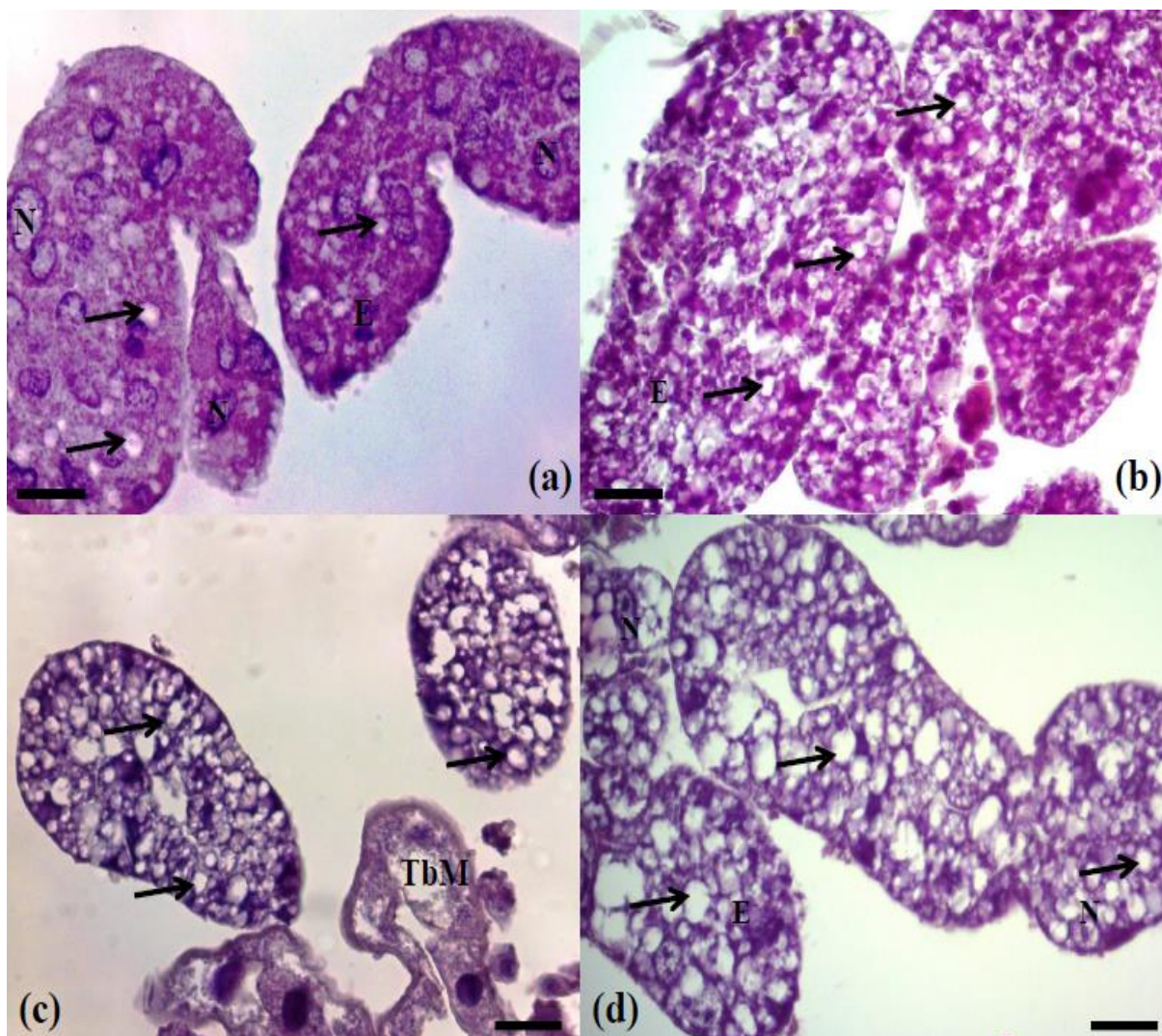


Figura 5 – Microscopia óptica do corpo gorduroso de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae), fêmeas: (a) e (c) três dias após a contaminação com o ingrediente ativo Isoxaflutole na concentração maior que a comercial, ingestão e pulverização, respectivamente. (b) e (d). seis dias após a contaminação com o ingrediente ativo na concentração maior que a comercial, ingestão e pulverização, respectivamente. Vesículas (setas); Núcleo dos trofócitos (N); E (enócitos); TbM (Túbulo de Malpighi).Coloração: H.E. Barra Escala = 50μm.

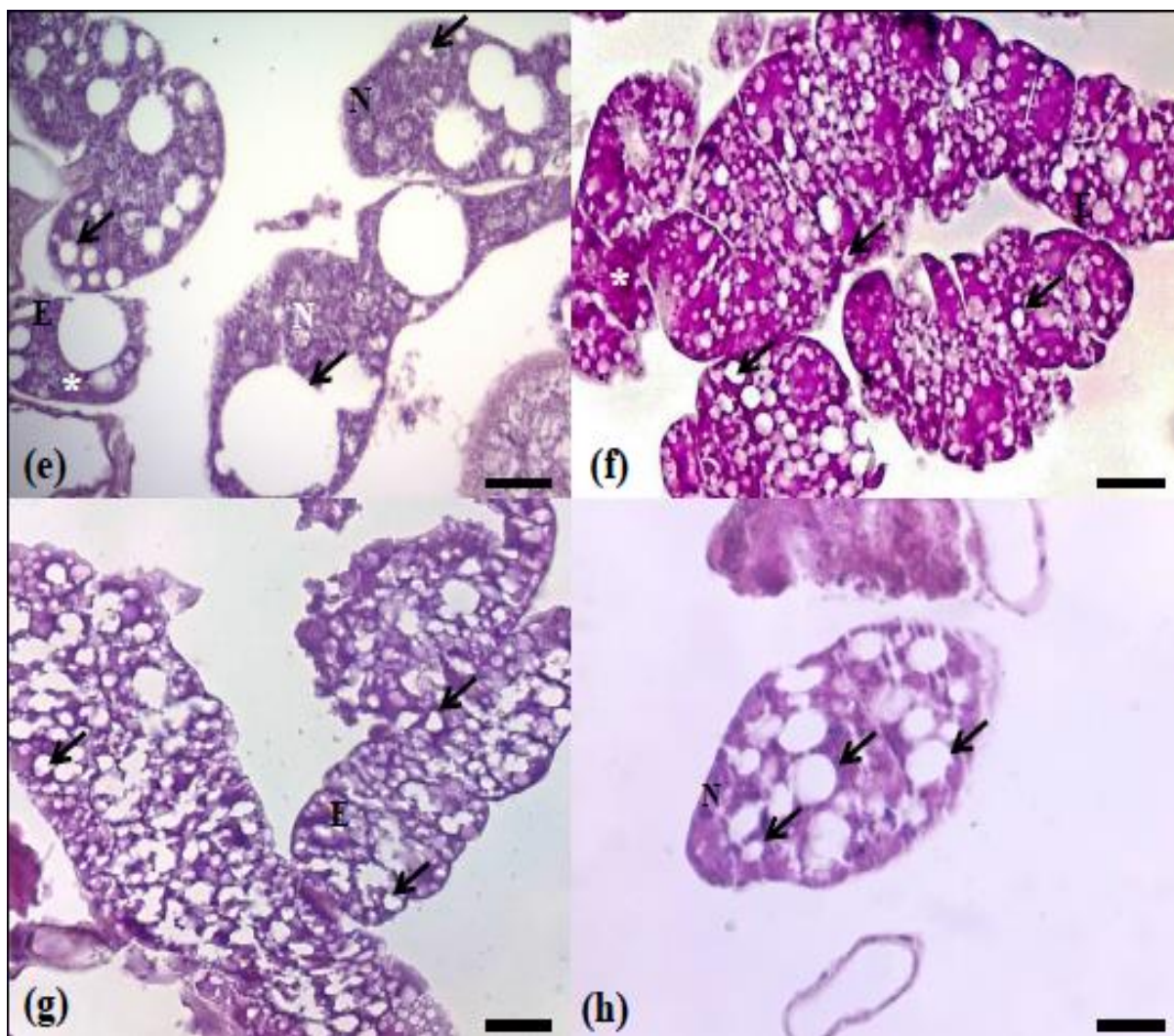


Figura 6 – Microscopia óptica do corpo gorduroso de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae), fêmeas: (e) e (g) três dias após a contaminação com o ingrediente ativo Isoxaflutole na concentração igual a comercial, ingestão e pulverização, respectivamente. (f) e (h) seis dias após a contaminação com o ingrediente ativo Isoxaflutole na concentração igual a comercial, ingestão e pulverização, respectivamente. Vesículas (setas); Núcleo dos trofócitos (N); E (enócitos); citoplasma do trofócito (asterisco); Coloração: H.E. Barra Escala = 50µm

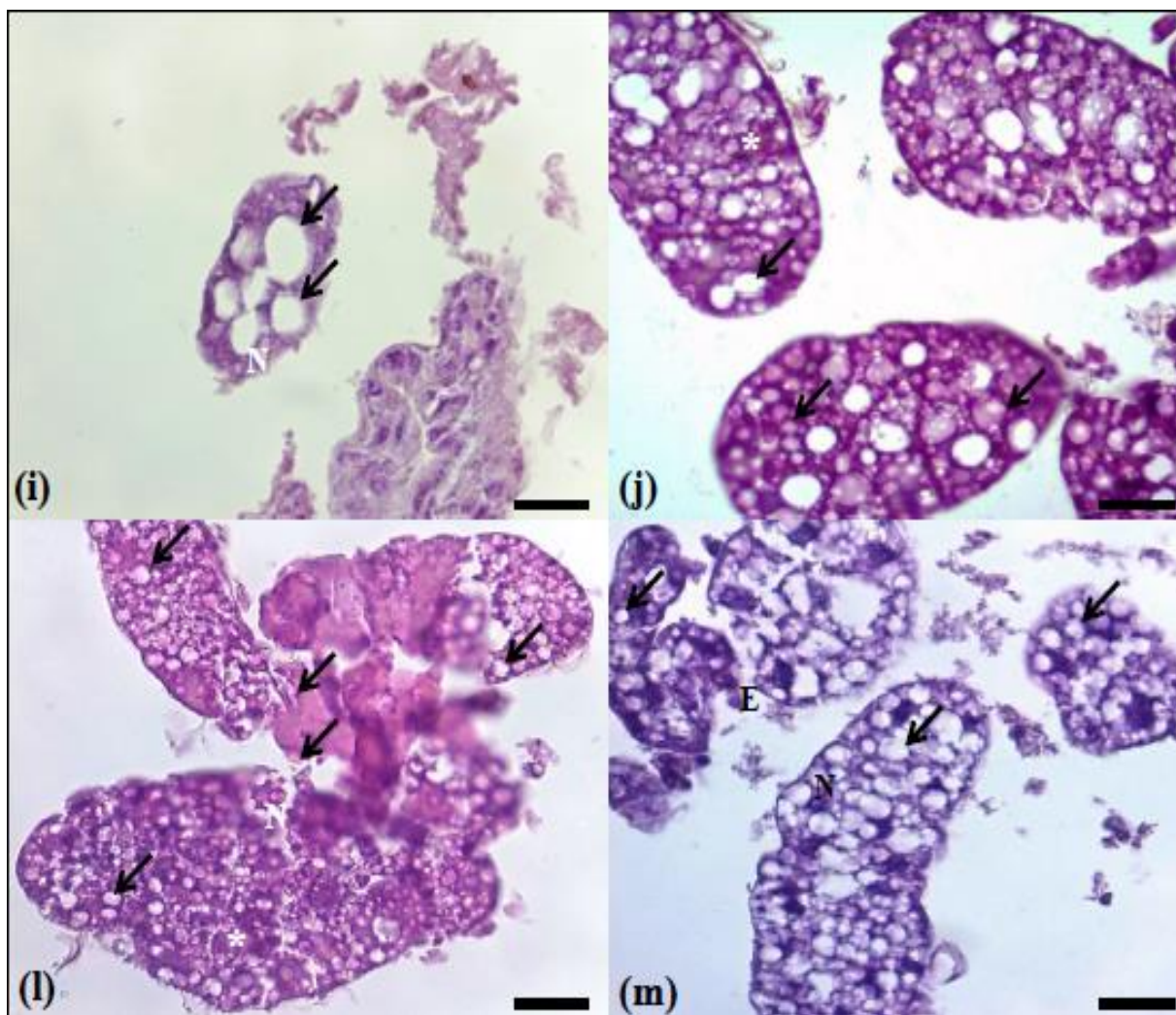


Figura 7 – Microscopia óptica do corpo gorduroso de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae), fêmeas: (i) e (l) três dias após a contaminação com o ingrediente ativo Isoxaflutole na concentração menor que a comercial, ingestão e pulverização, respectivamente. (j) e (m) seis dias após a contaminação com o ingrediente ativo Isoxaflutole na concentração menor que a comercial, ingestão e pulverização, respectivamente. Vesículas (setas); Núcleo dos trofócitos (N); E (enócitos); Citoplasma do Trofócito (asterisco). Coloração: H.E. Barra Escala = 50μm

DISCUSSÃO

MORFOLOGIA E CITOHISTOLOGIA DA HEMOLINFA DE *Podisus nigrispinus*.

O número de células na hemolinfa e os tipos morfológicos, os hemócitos, estão relacionados às características fisiológicas do organismo e seu estágio de desenvolvimento, podendo variar entre as diferentes espécies de insetos (PAL & KUMAR, 2014). Em insetos hemimetábolos, como os Hemiptera, a quantidade e a variedade dos hemócitos são geralmente similares nas fases ninfal e adulta (ROSALES, 2017).

Um dos efeitos do herbicida Isoxaflutole, tanto o formulado comercial (fordor[®]) quanto do ingrediente ativo (i.a.) livre da formulação, sobre o predador *P. nigrispinus* pôde ser avaliado na hemolinfa, por meio da observação direta de alterações como o aumento no número e tipos de hemócitos, por campo analisado, correspondentes há três dias após a contaminação, pelos tratamentos por ingestão ou por pulverização do herbicida. No bioensaio com o formulado comercial do Isoxaflutole, a relativa abundância de granulócitos e plasmatócitos, nesse estudo, pode ser corroborada por outros resultados relatados na literatura sobre as consequentes alterações da hemolinfa na mobilização e transporte de células com papel fagocitário/imunológico em insetos sob esse tipo de estresse químico (INAGAKI *et al.*, 2012; KRŮČEK *et al.*, 2015; SMITH *et al.*, 2015; RAVAIANO *et al.*, 2018).

A relativa similaridade na abundância de hemócitos por campo, observada nos resultados dos tratamentos por ingestão e pulverização deve-se, provavelmente, a presença de adjuvantes no formulado comercial que facilitariam a incorporação do herbicida através do exoesqueleto do inseto, aumentando sua difusão pela hemocele. No entanto, o ambiente natural é dinâmico e o inseto, por meio de comportamento específico, pode fugir ou mesmo se esconder, reduzindo o contato direto com o agrotóxico.

Nos resultados observados para o bioensaio com o ingrediente ativo, nota-se que as alterações mais significativas ocorreram nos tratamentos por ingestão e com a maior concentração do i.a. A priori isso se justifica, pois a solução com o ingrediente ativo não possui os adjuvantes encontrados no formulado comercial e, nesse caso, o exoesqueleto funcionou como uma barreira física reduzindo a quantidade de herbicida que se difundiu pelo corpo do inseto. Nesse tratamento também se observa um maior número de prohemócitos por campo quando comparado com os outros tratamentos por ingestão. Possivelmente, essa maior concentração do i.a. foi identificada pelo sistema celular do inseto e traduzida como um tipo de estresse químico. Esse evento estimulou a proliferação de prohemócitos, considerando-se que

essas células são precursoras dos demais tipos celulares (BROWNE *et al.*, 2013; ROSALES, 2017).

Essas variações observadas, principalmente quando se compara os tratamentos por pulverização e ingestão, fortalecem a hipótese de que, por via oral, o inseto é contaminado mais rapidamente e em maior quantidade, tanto por se alimentar da presa quanto por sugar a seiva do vegetal que incorporou o herbicida, principalmente no caso de zoofitófagos como *P. nigrispinus* (ZHU *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2016; GRIGOLLI *et al.*, 2017;).

MORFOLOGIA E CITOISTOLOGIA DO CORPO GORDUROSO DE *Podisus nigrispinus*.

Além do papel na utilização e armazenamento de lipídeos, o corpo gorduroso é um tecido com grande atividade no metabolismo e na biossíntese de substâncias vitais à fisiologia desses organismos (LI *et al.*, 2019). Este atua como recurso nutricional em períodos de inanição e ainda na destoxificação de substâncias, podendo estocar lipídeos na forma de vesículas e ser responsável, além do metabolismo energético, pela transferência de reservas para os ovócitos, via hemolinfa além de atuar na resposta imune (ARRESE & SULAGES, 2010).

No presente estudo, a morfologia do corpo gorduroso dos indivíduos submetidos à contaminação pelo formulado comercial Isoxaflutole (Fordor[®]), mostrou-se alterada quando comparada aos indivíduos não contaminados. Isso indica uma provável mudança na rota metabólica que resultou na aparente redução do volume total e do número de vesículas podendo ser considerada uma resposta adaptativa à presença do contaminante. Essa redução aparente está relacionada à diminuição do número de vesículas para o armazenamento de lipídeos. Outras alterações como coloração mais intensa do citoplasma dos trofócitos e uma maior presença dos enócitos justificam esse viés bioquímico, quando se considera os papéis fisiológicos atribuídos a esse grupo celular (ARRESE & SULAGES, 2010; FERREIRA *et al.*, 2011; MARTINS & RAMALHO-ORTIGÃO, 2012).

Esse comportamento foi refletido pelas mudanças ocorridas nas características do corpo gorduroso, como a redução do volume total e das vesículas lipídicas, observadas após três dias da contaminação com o formulado comercial. No sexto dia, após a contaminação o tecido já demonstrava uma transição entre as características daquele após o terceiro dia e a condição controle. Assim, após nove dias a partir da contaminação, observou-se a recomposição à condição morfológica normal ou similar àquela encontrada nos tratamentos controle.

Essas mudanças na rota metabólica podem estar relacionadas a um processo gradual de destoxificação, com o corpo gorduroso respondendo ao estímulo negativo. Entretanto, outros trabalhos apontam um viés diferente para os resultados observados em experimentos com agrotóxicos, indicando um aumento morfológico aparente da massa do corpo gorduroso refletida pela contaminação, mas sem a análise citohistológica do tecido (REIS *et al.*, 2018).

Os resultados observados nesse tecido a partir da contaminação com o ingrediente ativo, três dias após a contaminação, também indicaram mudanças morfológicas significativas. Como foram testadas três concentrações diferentes, em cada uma o efeito do herbicida manifestou-se mais intensamente no tratamento por ingestão na maior concentração do ingrediente ativo. Diferentemente do que ocorreu com o corpo gorduroso em presença do formulado comercial, com o i.a. o tecido ficou intensamente corado e aparentemente sem vesículas. O tamanho relativo do núcleo dos trofócitos e as características da cromatina indicam maior atividade metabólica de síntese não lipídica, com, por exemplo, a produção de proteínas para evitar a formação de espécies reativas do oxigênio (ROS) (KRŮČEK *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2019)

Ao longo dos tratamentos com concentração do ingrediente ativo igual a do formulado comercial, aos seis dias após a contaminação, as vesículas aumentaram em número, com aspecto vacuolizado, mas o tecido do corpo gorduroso permaneceu ainda bem corado. Uma hipótese é que, sob certas condições, esse tecido retém o composto tóxico em vesículas grandes impedindo sua difusão pelo corpo do inseto enquanto redireciona a via metabólica, caracterizada pela síntese não lipídica. Processo metabólico semelhante ocorre com o tecido adiposo de mamíferos ao armazenar agrotóxicos impedindo sua difusão rápida para outros órgãos através de uma imobilização (KUVAREGA & TARU, 2007; CRAVEDI *et al.*, 2013).

Após seis dias e na menor concentração do i.a. o corpo gorduroso não apresentou diferenças entre o tratamento por ingestão comparado com o tratamento por pulverização. Observou-se um aumento do número de vesículas não vacuolizadas caracterizando síntese de lipídeos. Esses achados sugerem que em um espaço de tempo suficiente, o predador *P. nigripinus* é capaz de metabolizar o herbicida quando é exposto a diferentes doses, por meio da imobilização e armazenamento em vesículas maiores e pouco numerosas, e redirecionamento da via bioquímica. Após esse processo, parece recuperar suas características morfológicas de biossíntese e armazenamento de lipídeos.

CONCLUSÃO

As avaliações dos resultados obtidos nesse estudo, por meio da análise das características citohistológicas da hemolinfa e do corpo gorduroso de fêmeas de *P. nigrispinus*, contaminadas com dose subletal do formulado comercial Isoxaflutole (Fordor®) e do ingrediente ativo, permitiram concluir que esse herbicida promove alterações morfológicas que refletem mudanças no metabolismo desse predador.

As alterações que ocorreram na hemolinfa indicam que as células responsáveis pela resposta imunológica, os hemócitos, proliferaram em resposta ao contaminante, atuando como uma barreira dinâmica reduzindo a difusão do herbicida pela hemolinfa.

As mudanças também foram significativas na morfologia do corpo gorduroso, com alteração do volume total aparente do tecido, indicado pelo padrão celular, pelo número das células com vesículas que armazenam lipídeos e tamanho dessas vesículas, indicando mudança da via bioquímica, ao reduzir a síntese e o armazenamento de lipídeos em prol da destoxificação do herbicida.

Além das análises realizadas por este estudo, procedimentos em nível ultra-estrutural e molecular deverão ser conduzidos visando obter ainda mais detalhes das relativas alterações celulares observadas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S.N.; SERRÃO, J.E.; MELO, A.L. 2010. Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. *Micron*, 41: 592–597.
- ARRESE, E.L.; SOULAGES, J.L., 2010. Insect fat body: Energy, Metabolism and Regulation. *Annual Review of Entomology*, 55: 207-225.
- BIRNER-GRUENBERGER, R.; BICKMEYER, I.; LANGE, J.; HEHLERT, P.; HERMETTER, A.; KOLLROSER, K.; RECHBERGER, G.N.; KÜHNLEIN, R.P. 2012. Functional fat body proteomics and gene targeting reveal in vivo functions of *Drosophila melanogaster* α -Esterase-7. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42: 220-229.
- BROWNE, N.; HEELAN, M; KAVANAGH, K. 2013. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*, 4: 597–603.
- BURNS K.A.; GUTZWILLER L.M.; TOMOYASU Y.; GEBELEIN B. 2012. Oenocyte development in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Development Genes and Evolution*, 222: 77–88
- CHARLES, H.M.; KILLIAN, K.A. 2015. Response of the insect immune system to three different immune challenges. *Journal Insect Physiology*, 81: 97-108.
- CHAVES V.E.; FRASSON, D.; KAWASHITA, N.H. 2011. Several agents and pathways regulate lipolysis in adipocytes. *Biochimie*, 93: 1631–1640
- COSTA-LEONARDO, A.M.; LARANJO, L.T.; JANEI, V.; HAIFIG, I. 2013. The fat body of termites: functions and stored materials. *Jornal of Insect Physiology*, 59: 577-587.
- CRAVEDI, J.P.; DELOUS, G.; ZALKO, D.; VIGUIÉ, C.; DEBRAUWER, L. 2013. Disposition of fipronil in rats. *Chemosphere*, 93: 2276-2283.

DE ASSIS, W.A.; MALTA, J.; PIMENTA, P.F.P.; RAMALHO-ORTIGÃO, J.M.; MARTINS, G.F., 2014. The characterization of the fat bodies and oenocytes in the adult females of the sandfly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Arthropod Structure & Development*, 43: 501–509.

DUKE, S.O. 2017. The History and current status of glyphosate. *Pest Management Science*, 74: 1027-1034.

FERREIRA, R.A.C.; TOMOTAKE, M.E.M.; CONTE, H. 2011. Morfohistologia do corpo gorduroso perivisceral em adultos de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae). *Ambiência*, 7: 489-499.

GONÇALVES, T.S.; SOARES, M.A.; SANTOS, C.A.; SANTOS, D.A.; SANTOS, J.B. and BARROSO, G.A. 2016. Does ingestion of isoxaflutole herbicide affect the midgut and salivary glands of Pentatomidae predators? *Planta Daninha*, 34: 125-132.

GRIGOLLI, J.F.J.; GRIGOLLI, M.M.K.; RAMALHO, D.G.; MARTINS, A.L.; VACARI, A.M.; DE BORTOLI, S.A. 2017. Phytophagy of the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera:Pentatomidae) fed on prey and Brassicaceae. *Brazilian Journal of Biology*, 77: 703–709.

HOSAMANI, R. 2013. Acute exposure of *Drosophila melanogaster* to paraquat causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 83: 25–40.

INAGAKI, Y.; MATSUMOTO, T.; KATAOKA, K.; MATSUHASHI, N.; SEKIMIZU, K., 2012. Evaluation of drug-induced tissue injury by measuring alanine aminotransferase (ATL) activity in silkworm hemolymph. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 13: 1-17.

JAMES, R.R.; XU, J. 2012. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109: 175-182.

KINGSOLVER, M.B.; HUANG, Z.; HARDY, R.W. 2013. Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors and connections. *Journal of Molecular Biology*, 425: 4921–4936.

KRŮČEK, T.; KORANDOVÁ, M.; ŠERY, M.; FRYDRYCHOVÁ, R. Č. 2015. Effect of low doses of herbicide paraquat on antioxidant defense in *Drosophila*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 88: 235-248.

KUVAREGA, A.T.; TARU, P. 2007. Accumulation of Endosulfan in Wild Rat, *Rattus norvegicus* as a Result of Application to Soya Bean in Mazoe (Zimbabwe). *Environmental Monitoring and Assessment*, 125: 333–345.

LEITE, G.L.D.; PAULO, P.D.; ZANUNCIO, J.C.; TAVARES, W DE S; ALVARENGA, A.C.; DOURADO, L.R.; BISPO, E.P.R.; SOARES, M.A. 2016. Herbicide toxicity, selectivity and hormesis of nicosulfuron on 10 Trichogrammatidae (Hymenoptera) species parasitizing (Lepidoptera: Pyralidae) eggs. *Journal of Environmental Science and Health. Part B. Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 30: 1-7.

LI, S., YU, X., QILI FENG, Q. 2019. Fat body biology in the last decade. *Annual Review of Entomology*, 64: 315–333.

MARTINS, G.F.; RAMALHO-ORTIGÃO, J.M. 2012. Oenocytes in insects. *Invertebrate Survival Journal*, 9: 139-152

McMANUS, J.F.A.; MOWRY, R.W. 1960. Staining methods: histologic and histochemical. Paul Hoeber, Inc., Medical Division of Harper & Brother. New York. 407 p.

MEHDI, S.H.; QAMAR, A. 2013. Paraquat-induced ultrastructural changes and DNA damage in the nervous system is mediated via oxidative-stress-induced cytotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *Toxicological Sciences*, 134: 355–365.

MENEZES, C.W.G.; SOARES, M.A.; FONSECA A.J.; DOS SANTOS, J.B.; CAMILO, S.S.; ZANUNCIO, J.C. 2014. *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) as a indicator of

toxicity of herbicides registered for corn in Brazil. Chilean Journal of Agricultural Research, 74: 361-365.

MUSSABEKOVA, A.; DAEFFLER, L.; IMLER, J.L. 2017. Innate and intrinsic antiviral immunity in *Drosophila*. Cellular and Molecular Life Sciences, 74: 2039–54

PAL, R.; KUMAR, K., 2014. A comparative study of haemocytes in three cyclorrhaphous dipteran flies. International Journal of Tropical Insect Science, 34: 207-216.

PANDEY, J.P.; TIWARI, R.K. 2012. An Overview of Insect Hemocyte Science and its Future Application in Applied and Biomedical Fields. American Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2: 82-105.

PARK, M.S.; PARK, P.; TAKEDA, M. 2013. Roles of fat body trophocytes, mycetocytes and urocytes in the American cockroach, *Periplaneta americana* under starvation conditions: An ultrastructural study. Arthropod Structure & Development, 42: 287-295.

PASCINI, T.V.; ALBENY, D.S.; RAMALHO-ORTIGÃO, M.; VILELA, E.F.; SERRÃO, J.E.; MARTINS, G.F. 2011. Changes in the fat body during the post-embryonic development of the predator *Toxorhynchites theobaldi* (Dyar & Knab) (Diptera: Culicidae). Neotropical Entomology, 40: 456-461.

RAVAIANO, S.V.; BARBOSA, W.F.; TOMEAB, H.V.V.; CAMPOS, L.A.O.; MARTINS, G.F. 2018. Acute and oral exposure to imidacloprid does not affect the number of circulating hemocytes in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* post immune challenge. Pesticide Biochemistry and Physiology, 152: 24-28.

ROSALES, C. 2017. Cellular and molecular mechanisms of insect immunity. Chapter 8, pp. 179-212. In: Insect Physiology and Ecology. Edited by Vonnice D. C. Shields, april, 2017.

SIDDIQUI, M.I.; AL-KHALIFA, M.S. 2012. Circulating haemocytes in insects: phylogenic of their types. Pakistan Journal of Zoology, 44: 1743-1750.

SMITH, R.C.; BARILLAS-MURY, C.; JACOBS-LORENA, M. 2015. Hemocyte differentiation mediates the mosquito late-phase immune response against *Plasmodium* in *Anopheles gambiae*. Proceedings of Natural Academy of Science, 112: E3412–E3420.

TURGAY-IZZETOĞLU, G.; GÜLMEZ, M. 2019. Characterization of fat body cells at different developmental stages of *Culex pipiens*. Acta Histochemica, 121: 460-471.

ZALLER, J.G.; HEIGL, F.; RUESS, L.; GRABMAIER, A. 2014. Glyphosate herbicide affects belowground interactions between earthworms and symbiotic mycorrhizal fungi in a model ecosystem. Scientific Reports, 4: 1-8.

ZANUNCIO, J.C.; JUSSELINO-FILHO, P.; RIBEIRO, R.C.; ZANUNCIO, T.V.; RAMALHO, F.S.; SERRÃO, J.E., 2011. Hormetic responses of a stinkbug predator to sublethal doses of pyrethroid. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 87: 608-614.

ZHANG, Y., XI, Y., 2014. Fat body development and its function in energy storage and nutrient sensing in *Drosophila melanogaster*. Journal of Tissue Science and Engineering, 6: 1–8.

ZHU, W.; SCHMEHL, D.R.; MULLIN, C.A.; FRAZIER, J.L. 2014. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. PLoS One, 9: 1-11.

3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Toda monocultura está sujeita à matocompetição e ao ataque de insetos pragas e, por causa disso, esses organismos podem afetar o desenvolvimento e a produtividade desse sistema de silvicultura. Como forma de evitar danos irreversíveis utilizam-se diversas formas de controle sendo que a principal é por meio de substâncias químicas, como os herbicidas e inseticidas.

Apesar da sua comprovada eficiência os agrotóxicos podem causar danos aos organismos não alvos, afetando a população de inimigos naturais por meio das alterações do comportamento e da biologia reprodutiva. Esses efeitos tornam-se significativos quando o *fitness* da espécie fica comprometido

Em insetos a rapidez na passagem de uma fase do desenvolvimento para outra é vital, pois quanto mais longa for uma determinada fase, mais estará sujeita à predação e mais recurso será necessário para manter o desenvolvimento desse organismo.

Estudos mais minuciosos sobre os papéis da hemolinfa e do corpo gorduroso em insetos com potencial para controle biológico são de suma importância visto que alterações nas características desses tecidos podem indicar que as atividades metabólicas, reprodutivas e mesmo comportamentais foram comprometidas pela exposição às substâncias utilizadas para o controle de pragas, como os herbicidas.

Essas conclusões justificam-se pelo padrão morfológico do corpo gorduroso observado no final do experimento, quando este volta a sintetizar e armazenar lipídeos caracterizados pelo maior volume aparente e pelo aumento do número e tamanho das vesículas.

As fases imaturas dos descendentes da geração parental exposta ao contaminante foram afetadas significativamente porque, possivelmente, parte do herbicida foi transferido para os ovócitos pela geração parental, ou seja, o corpo gorduroso metabolizou o herbicida mas ainda assim uma fração significativa foi transferida horizontalmente.

Se a geração descendente da parental contaminada estender as fases do desenvolvimento em seu ambiente natural, possivelmente, o potencial reprodutivo da espécie ficará comprometido.

Diante de todos os resultados obtidos nesse trabalho sugere-se projetos de longo prazo para verificar qual o tempo necessário para o inseto destoxificar. Nesse contexto, deve-se conduzir estudos citohistológicos em cada fase ninfal para justificar os diferentes resultados observados referentes aos efeitos do herbicida durante o desenvolvimento do inseto.

